



# Analyse fonctionnelle du promoteur de la cembranetriène- diol-synthase spécifique des trichomes de *Nicotiana sylvestris*

Hanane Ennajdaoui

## ► To cite this version:

Hanane Ennajdaoui. Analyse fonctionnelle du promoteur de la cembranetriène- diol-synthase spécifique des trichomes de *Nicotiana sylvestris*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble; Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00926325

**HAL Id: tel-00926325**

**<https://theses.hal.science/tel-00926325>**

Submitted on 9 Jan 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Hanane ENNAJDAOUI**

Le Vendredi 25 septembre 2009

**Analyse fonctionnelle du promoteur de la cembrane-  
triène-diol-synthase spécifique des trichomes de  
*Nicotiana sylvestris***

Thèse co-dirigée par

**Mr HERZOG Michel et Mr VACHON Gilles**

Composition du Jury

Mr TISSIER Alain – Université Montpellier II	Président
Mr CAROL Pierre – Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mr CAISSARD Jean-Claude – Université Jean Monnet	Rapporteur
Mr HERZOG Michel – Université Joseph Fourier	Examineur
Mr VACHON Gilles – Université Joseph Fourier	Examineur

*Bien que ne faisant apparaître qu'un seul nom en première page, une thèse n'est pas le fruit d'un travail individuel.*

*Mes premiers remerciements vont à Michel Herzog qui m'a accueilli dans son laboratoire et dans son équipe. Je le remercie pour la confiance et le temps qu'il m'a accordé malgré ses nombreuses occupations.*

*Des mots classiques ne suffiront jamais à exprimer toute la gratitude et le respect que j'ai pour Gilles Vachon. Tant au niveau humain que scientifique, je le remercie de m'avoir formé, de m'avoir soutenu et surtout d'avoir cru en moi dans les moments difficiles. Je lui dois beaucoup.*

*Je tiens à remercier Daniel Perazza pour son œil critique sur mon travail tant à la paillassette que dans les discussions et aussi pour ses encouragements.*

*Je remercie ce footballeur passionné, Frédéric Laporte, pour sa gentillesse, sa présence, ses plaisanteries et pour son amitié. Il m'a fait découvrir les joies de la raquette de neige.*

*A Florian, en trois ans j'ai appris à le connaître, nos mises au point dans le bureau ont été plutôt bénéfique puisque il est devenu un ami. Je le remercie pour les discussions philosophiques interminables, nos fous rires, nos colères et sa joie de vivre.*

*Je remercie l'équipe Librophyt de m'a accueilli et m'a fait découvrir l'esprit d'une startup. Un remerciement particulier à Alain Tissier et Christophe Sallaut pour avoir cru en moi et pour m'avoir suivi durant ces trois ans de thèse.*

*Des virées nocturnes au labo sans parler des week-end à bosser, je remercie Iga, qui est devenue une amie chère. Merci pour sa présence et son soutien sans faille. Merci pour avoir partagé les tensions de ces années avec moi.*

*Je remercie ma grande sœur Abir, ses conseils scientifiques et surtout sa sagesse. Un petit clin d'œil son mari et ses deux petites filles qui m'ont appelés « Khalou Hanane ».*

*Je tiens à remercier Livia, une très bonne amie, sans qui la fin de cette thèse aurait été plus difficile. Je la remercie pour son optimisme, ses conseils scientifiques, pour m'avoir poussé à faire ce qui était bon mon avenir dans la recherche. Je la remercie de m'avoir prêté son épaule dans les moments difficiles. Un clin d'œil pour les moments de détente que nous avons partagé à l'extérieur du labo.... Une pensée pour son mari Frédéric et son fils Luca.*

*Je remercie Léa pour sa présence pétillante, Edouard pour sa disponibilité et nos coups de colère.*

*A Anne Marie, je la remercie pour sa présence, pour nos riches discussions de fin de journées, pour le prêt de son matériel et pour le chocolat. Je remercie Gaby, Florence et A. Marie pour m'avoir donné la chance d'enseigner et d'apprécier l'envers du décor de l'enseignement.*

*Je remercie tout les autres membres de ce labo qui par des mots, une aide ou juste une discussion de couloir ont rendu ce travail plus facile.*

*Pour finir, je tiens à remercier mes parents qui ont passé leur vie à me pousser malgré les difficultés, sans eux je n'en serais pas là. Je remercie mes trois frères Aboubakr, Mohamed et Zakaria qui sans conteste m'ont poussé, encourager et soutenu jusqu'à la fin de ce travail*

*Contrôle positif, contrôle négatif...*



<b>Introduction</b>	<b>1</b>
I. Les trichomes glandulaires	3
A. <i>Données anatomiques</i>	3
B. <i>Développement du trichome d'Arabidopsis thaliana</i>	4
1. Initiation des trichomes	4
2. Morphogenèse des trichomes	5
3. Inhibition latérale de la formation des trichomes	5
C. <i>Développement d'une glande peltée de M. x piperita</i>	6
1. La phase pré-sécrétoire	7
2. Phase demi-sécrétoire	7
3. Phase sécrétoire et post sécrétoire	7
II. Les trichomes glandulaires : siège de synthèse de produits de sécrétion	8
A. <i>Les principaux Composés Organiques Volatils (VOCs)</i>	9
1. Les dérivés d'acide gras	9
2. Les dérivés d'acides aminés	9
3. Les terpènes	10
B. <i>Métabolisme des terpènes : composés majoritaires des trichomes</i>	10
1. La biosynthèse des précurseurs, l'IPP et le DMAPP	11
2. Condensation : naissance des terpènes :	14
C. <i>Mécanismes hypothétiques de sécrétion des VOCs</i>	20
1. La diffusion passive : <i>Petunia axillaris</i>	20
2. Transport ATP-dépendant : <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	21
3. Sécrétion granulocrine : <i>Dianthus caryophyllus</i> (carnation).	21
D. <i>Fonction des trichomes</i>	22
1. Rôle physique	22
2. Les TGSs et les animaux	23
III. Les composés terpéniques des trichomes de Nicotiana	27
A. <i>Physiologie et organisation des trichomes de Nicotiana</i>	27
B. <i>Terpènes synthétisés dans les trichomes de Nicotiana</i>	28
IV. Expression spécifique des gènes de terpènes synthases dans le trichome	31
A. <i>Eléments cis-régulateurs des promoteurs spécifiques des trichomes</i>	31
B. <i>Facteurs trans-régulateurs des promoteurs spécifiques des trichomes</i>	33
V. Amélioration de la production de composés organiques	34
A. <i>Cultures cellulaires et tissulaires de plantes</i>	34
B. <i>Culture de microorganismes et production de terpénoïdes</i>	35
C. <i>Les méthodes de transgénèse visant les TGS</i>	36
1. Amélioration de la qualité de l'huile essentielle de la menthe	36
2. Transgénèse hétérologue dans <i>Nicotiana</i>	36
VI. Projet de recherche	37

A.	<i>Le procédé Librophyt</i>	37
B.	<i>Objectifs du projet de thèse</i>	39
	<b>Résultats</b>	<b>41</b>
	<i>Chapitre I : Analyse fonctionnelle de <math>P_{1.1NsTPSO2a}</math></i>	41
I.	Expression spécifique dans les têtes des trichomes glandulaires (TGSs)	41
II.	Analyse bioinformatique des promoteurs de terpènes synthases de TGSs	43
A.	<i>Identification de motifs consensus sur cinq promoteurs trichomes-spécifiques</i>	43
B.	<i>Analyse des motifs identifiés dans la séquence de <math>P_{1.1NsTPSO2a}</math></i>	45
III.	Analyse fonctionnelle du promoteur 1.1NsTPSO2a in planta	47
A.	<i>Analyse préliminaire par biolistique</i>	49
B.	<i>Analyse de <math>P_{1.1NsTPSO2a}</math> par transformation stable dans <i>N.sylvestris</i> <math>ihpNsTPSO2a1.751</math></i>	51
C.	<i>Analyse fonctionnelle des fragments 4c et 400c</i>	56
1.	Fonctionnalité du fragment 4c	57
2.	Fonctionnalité de la région 400c	59
IV.	Conclusion	59
	<i>Chapitre II : Recherche d'un facteur trans-régulateur du <math>P_{1.1NsTPSO2a}</math></i>	60
I.	Construction de la banque d'ADNc pleine longueur de TGSs de <i>N.sylvestris</i>	61
A.	<i>Amplification et clonage d'une banque d'ADNc pleine longueur</i>	61
B.	<i>Recherche de facteur de transcription se liant aux éléments 4c et 400c par crible simple hybride</i>	64
C.	<i>Recherche de candidats reconnaissant le fragment 400c</i>	64
II.	La protéine NsZnf possède un domaine d'interaction à l'ADN	66
A.	<i>Analyse bioinformatique de la protéine NsZnf</i>	66
B.	<i>Motifs protéiques de la protéine NsZnf</i>	67
C.	<i>Analyse phylogénétique de NsZnf</i>	71
III.	Analyse fonctionnelle de la protéine NsZnf	72
A.	<i>Localisation intracellulaire de la protéine fusion GFP::NsZnf</i>	72
B.	<i>Essais de mise en évidence in vitro d'une interaction directe entre l'ADN cible 400c et le facteur NsZnf.</i>	73
1.	Surexpression de la protéine NsZnf recombinante	73
2.	Détermination de l'interaction entre NsZnf et le promoteur de <i>NsTPSO2a</i>	76
IV.	Conclusion	78
	<b>Discussion</b>	<b>79</b>
	<b>Conclusion générale</b>	<b>86</b>
	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>88</b>
I.	Matériels biologiques et conditions de culture.	88
A.	<i>Matériel végétal</i>	88
1.	Variétés de tabac	88
2.	Milieus et conditions de culture	88
B.	<i>Système bactérien utilisé</i>	90
1.	Génotypes des souches utilisées	90
2.	Milieus et conditions de cultures bactériennes	90

C.	<i>Système levure utilisé</i>	91
1.	Souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisée	91
2.	Milieux et conditions de culture	91
II.	Manipulations génétiques des plantes	93
A.	<i>Transformation stable de Nicotiana tabacum cv. sylvestris RNAi</i>	93
1.	Transformation par régénération de cals	93
2.	Sélection des transformants	93
B.	<i>Transformation transitoire de N. benthamiana par biolistique</i>	93
1.	Préparation ex-temporannée des microbilles	94
2.	Adsorption de l'ADN	94
3.	Préparation des disques foliaires	94
4.	Bombardements	94
5.	Détection de l'expression transitoire du gène rapporteur <i>GUS</i>	95
C.	<i>Transformation transitoire par infiltration de N. benthamiana</i>	95
III.	Biologie moléculaire	96
A.	<i>Techniques de clonage et transformation bactérienne</i>	96
1.	Clonage enzymatique	96
2.	Clonage d'un produit PCR par T/A cloning	98
3.	Clonage GATEWAY™	98
4.	Vecteurs utilisés et constructions réalisées	100
5.	Transformation bactérienne, amplification de plasmide et séquençage	103
B.	<i>Identification de facteur de transcription</i>	105
1.	Construction d'une banque d'ADNc de trichomes de <i>N.sylvestris</i>	105
2.	Crible simple hybride de la banque d'ADNc de trichomes de <i>N.sylvestris</i>	105
C.	<i>Analyse de la protéine NsZnf issue du crible simple hybride</i>	109
1.	Purification de protéines munies d'une étiquette	109
2.	Détection de protéines étiquetées	110
IV.	Etude de l'interaction NsZnf/400c par EMSA	112
A.	<i>Principe</i>	112
B.	<i>Electrophorèse et détection de la sonde biotinylée</i>	112
C.	<i>Transfert sur membrane de nitrocellulose N+</i>	113
D.	<i>Immunodétection de la sonde marquée</i>	113
V.	Biologie Cellulaire	113
A.	<i>Détection cytologique de l'expression du rapporteur GUS</i>	113
B.	<i>Microscopie et imagerie</i>	114
VI.	Bio-Informatique et analyses statistiques	115
A.	<i>Analyses de séquence</i>	115
B.	<i>Analyses statistiques</i>	115
	<b>Bibliographie</b>	<b>116</b>
	<b>Annexes</b>	<b>131</b>

# Liste des Abréviations

TE/LiAC	Tris EDTA/Acétate de Litium
ABA	Acide Abscissique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
A.t	<i>Arabidopsis thaliana</i>
3 AT	3-Amino-1,2,4-Triazole
AN	<i>ANGUSTIFOLIA</i>
BEAT	Benzyl-alcool-méthyltransférase
bZIP PBF	bZIP PBF
Ca	Calcium
CBT-diol	Cembrane-diol
CBTS-ol	Cembrane-ol
CCM1	Coculture Medium 1
CCT	CONSTANS, CO-like, et TOC1
Cd	Cadmium
CDP-ME	4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol
CDP-MEP 4	4 diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol 2-phosphate
Cl	Chlore
CMK	CDP-ME kinase
CMS	CDP-ME synthase
CPC	CAPRICE
CTP	Cytosine Tris Phosphate
CVOMT	chavicol méthyl-transférase.
CYC-1	terpène cyclase
CYP71D16	cytochrome de type P450
DMAPP	diméthylallyl diphosphate
DMT	3,5-diméthoxytoluène
DO <sub>600</sub>	Densité Optique 600 nm
DOF	DNA-binding with one finger
AD	domaine d'activation
DTT	DiThioTrethol
DXP	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
DXR	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase
DXS	DXP synthase
EGL3	ENHANCER OF GLABRA3
ETC1	ENHANCER OF TRY
FPP	farnésyl diphosphate
FPPS	farnésyl diphosphate synthase
GA	Gibbérelline
<i>GaMYB2</i>	<i>GaMYB2</i>
GERO	Germination 0
GFP	Green fluorescent Protein
GGPP	géranylgéranyl diphosphate

GGPPS	géranylgéranyl diphosphate synthase
GL1	GLABROUS1
GL2	GLABRA2
GL3	GLABRA3
GPP	géranyl diphosphate
GGPPS	géranyl diphosphate synthase
GUS	glucuronidase
HDS	HMBPP synthase
HMBPP ME-cPP	1-hydroxy-2-méthyl-2 <i>E</i> -butényl 4-diphosphate
HMG-CoA	3- hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
IDS	IPP synthase
ihp	intron hairpin
IPP	isopentényl diphosphate
LB	Luria Bertani Broth
LS	lignées sources
LTP	Lipides Transfert Protein
<i>LTP3</i>	gène de la Lipide Transfert Protein 3
<i>LTP6</i>	gène de la Lipide Transfert Protein 6
MEME	Multiple Em for Motifs Elicitation
MEP	2 <i>C</i> -méthyl-D-érythritol 4-phosphate
MEV	mévalonate/acétate
<i>MIXTA</i>	facteur MYB <i>MIXTA</i>
MVK	MEV kinase
MYB	MYB
N.t	<i>Nicotiana tabacum</i>
Na	Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
Ni	Nickel
NpABC1	transporteur ABC de <i>N.plumbaginifolia</i>
NsTax	<i>Nicotiana sylvestris</i> Taxadiène
<i>NsTPSO2a</i>	<i>Nicotiana sylvestris Terpene Synthase O2a</i>
NSTs	trichomes non sécréteurs
<i>Nt-ABI</i>	<i>N.tabacum</i> Abienol synthase
<i>NtCPS2</i>	<i>Nicotiana.tabacum</i> copalol diphosphate synthase
p/v	poids/volume
P <sub>1.1NsTPSO2a</sub>	Promoteur 1.1kb de la NsTPSO2a
P <sub>1.7NsTPSO2a</sub>	Promoteur 1.7kb de la NsTPSO2a
P <sub>35Smin</sub>	Promoteur 35S minimum
pb	Paire de bases
P <sub>CYP71D16</sub>	Promoteur du gène CYP71D16
PEG	Polyéthylèneglycol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMD	MVPP décarboxylase
PMK	MVP kinase

P <sub>NsTPSO2a</sub>	Promoteur du gène de NsTPSO2a
RE	réticulum endoplasmique
PCR	réaction de polymérisation en chaine
RHEs	Root hair-specific cis-Elements
RMKmCa	Root Medium Kanamycine Carbamycilline
RNAi	Ribonucleotide Nuclic Acid interference
Rpm	Rotation per minute
SMKmCa	Shoot Medium Kanamycine Carbamycilline
<i>SPY</i>	<i>SPYNDLY</i>
<i>SPK1</i>	<i>SPYKE1</i>
<i>SSTLH</i>	<i>SSTLH</i> Sesquiterpène synthase de <i>Lycopersicon hirsutum</i>
TBE	Tris Borate EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TGSs	trichomes glandulaires sécréteurs
TMB	1,3,5-triméthoxybenzène
TPS	Terpene Synthase
TRY	TRIPTYCHON
TT8	Transparent Testa Glabra 8
TTG	TRANSPARENT TESTA GLABRA
<i>TTG2</i>	<i>TRANSPARENT TESTA GLABRA2</i>
v/v	volume/volume
VOCs	composés organiques volatils
YPDA	YPDA
Zn	Zinc
<i>ZWI</i>	<i>ZWICHEL</i>
Ω	Oméga

## Introduction

Une grande diversité de projections uni- ou pluricellulaires existe à la surface des organes chez un large spectre de variétés végétales. Diverses classifications ont été suggérées notamment par Uphof (1962), essentiellement à partir de caractéristiques morphologiques. Les trichomes font partis de ces appendices aériens. La différence entre les trichomes (du grec *trichos*, poil) et les autres structures émergentes (papilles de roses, cavité de sécrétion du citron) (Figure 2) est le développement ontogénétique même si ces structures peuvent avoir des fonctions similaires comme la sécrétions de molécules de répulsion des pathogènes ou de thermorégulation. Les trichomes sont des structures épidermiques qui se développent sur les organes aériens de la plupart des plantes terrestres. Leur morphologie et leur fonction sont très variées selon les tissus et les espèces. Cependant, nous pouvons distinguer deux catégories fonctionnelles de trichomes. Les trichomes non sécréteurs (NSTs) et les trichomes glandulaires sécréteurs (TGSs) (Figure 1).

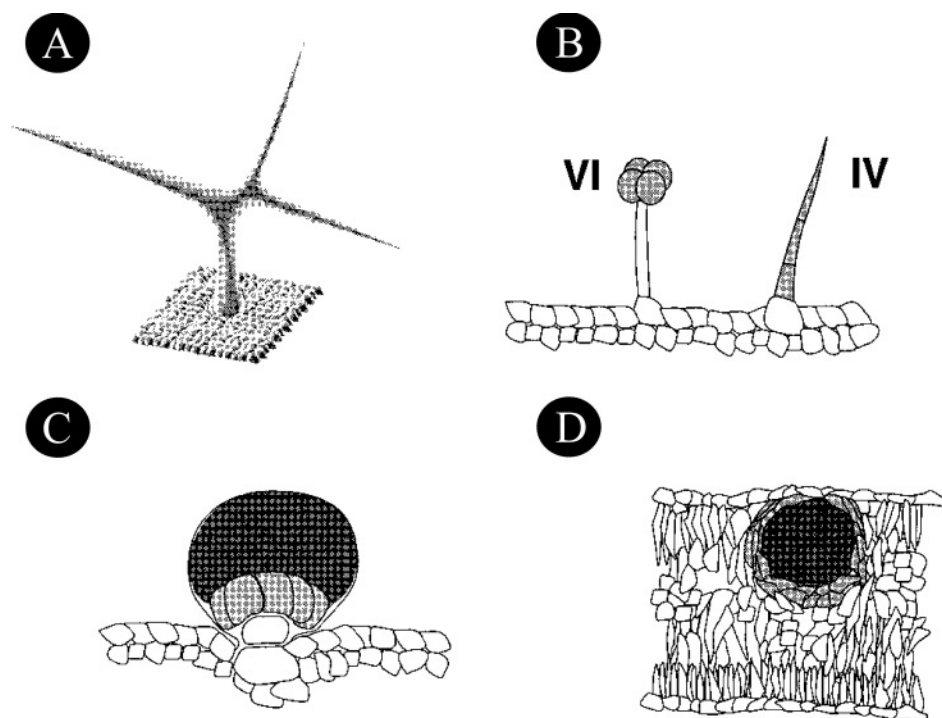


Figure 1 : Exemples de TGSs et NTGs de plantes.

A : Trichome non glandulaire d'*A.thaliana*. B : TGSs de type VI et IV de *L.esculentum*. Le type IV sécrète des esters de glucose et le type VI sécrète du 2-tri décanone, 2-undécanone et une variété de terpénoïdes. C : TGS de *Mentha piperita* qui accumule une huile essentielle constituée de monoterpénoïdes. D : Cavité sécrétrice typique d'*Eucalyptus* qui accumule des monoterpénoïdes. Les cellules sécrétrices sont en gris pour B, C et D. Les cavités de stockage de l'huile essentielle sont représentées en noir en C et D, (D'après, McCaskill et Croteau 1999).

Les TGSs produisent, stockent et libèrent des composés chimiques actifs comme des esters de sucres, des huiles essentielles ou encore des terpènes. Beaucoup de sécrétions ont un intérêt pour l'industrie des cosmétiques (santalol, menthol...) et l'industrie pharmaceutique (taxol, artémisinine...). Ces molécules issues de métabolisme secondaire sont pour la plupart des terpènes plus ou moins volatils produits ou pas par des trichomes sécréteurs. Toutefois le rendement de production industrielle de ces molécules d'intérêt reste faible (de l'ordre de 1% de la matière sèche). La production de molécules de synthèse ou encore l'exploitation extensive des ressources naturelles ne suffisent pas à satisfaire la demande de plus en plus grande. Ce constat a stimulé les recherches pour développer des approches biotechnologiques. Ceci dans le but de compléter les technologies de production de ces substances à forte valeur ajoutée.

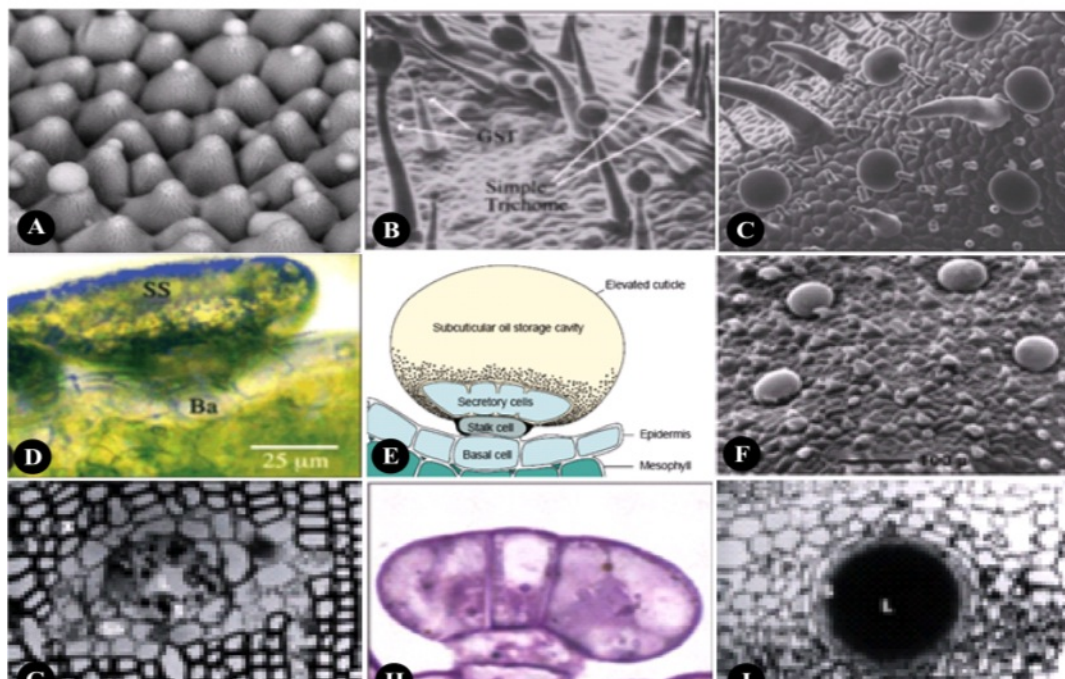


Figure 2 : Diversité des structures sécrétrices de plantes: A. Micrographie électronique de l'épiderme supérieur de rose (Bergounoux *et al.*, 2005). B : Trichomes de *Nicotiana tabacum* (Wagner *et al.*, 2004). C : surface de l'épiderme supérieur de feuille de menthe (photographie : J.C. Caissard). D : Trichome de *Prostanthera ovalifolia* (Gersbach, 2002). E : Schéma d'un trichome glandulaire pelté de *Mentha piperita* (Turner *et al.*, 2000). F : Trichomes glandulaires de l'épiderme d'une feuille de thym. G : Micrographie d'un canal résinifère de pin Jeffrey. H : Trichome glandulaire de *mentha x piperita* (Caissard *et al.*, 2004) I : Cavité de sécrétion de l'épiderme d'une feuille de citron.



Parmi les entreprises de biotechnologie, Librophyt a développé un système utilisant les trichomes sécréteurs du tabac comme usine de production. La stratégie générale consiste à réorienter le métabolisme terpénique de la plante en faveur de la molécule d'intérêt. Le défi innovant de ce projet est l'utilisation de ces cellules spécialisées que sont les trichomes au lieu d'un système hétérologue (bactérie, levure etc...). Nous nous proposons ici de participer à la compréhension des processus biologiques conduisant à la production de ces molécules par les trichomes glandulaires sécréteurs à l'échelle macroscopique et à l'échelle moléculaire.

### ***I. Les trichomes glandulaires***

#### ***A. Données anatomiques***

Les trichomes sécréteurs sont présents chez 30% des plantes vasculaires (Dell et McComb, 1978; Fahn, 2000) dont les Lamiacées, les Astéracées, les Géraniacées, les Solanacées et les Cannabinacées. Le terme de trichomes glandulaires englobe une grande variété de glandes. Elles diffèrent en fonction de la composition chimique de leur sécrétion, du type de stockage et de leur mode de production. Dans la distinction entre trichomes sécréteurs et non sécréteurs, tout type de molécules libérées vers l'extérieur par un trichome sera considéré comme sécrétion qu'elle soit volatile ou non volatile. Dans la classification des glandes intervient également leur localisation puisque une même glande peut se trouver sur les tissus reproducteurs ou végétatifs ainsi que leur fonction. Enfin la classification va prendre en compte leur fonction. Enfin, la distinction entre les différents groupes de trichomes glandulaires se fera au niveau morphologique et ultrastructural. Ainsi, sur les feuilles d'*Artemisia annua*, il existe des TGSs composés de dix cellules organisées par paire. L'analyse de l'ultrastructure de ces paires de cellules montre qu'elles auraient des fonctions différentes les unes des autres (Duke et Paul, 1993). Par ailleurs, de nombreuses espèces arborent sur leurs feuilles des TGSs qui sécrètent différentes substances, c'est le cas de *Nicotiana*, avec un TGS sécrétant du matériel résineux alors qu'un autre type de TGS sécrète une substance plus aqueuse. Des NSTs peuvent aussi cohabiter avec des TGSs. Leurs fonctions seraient de protéger les petits TGSs. Chez de nombreuses Lamiacées, deux types de trichomes glandulaires sont retrouvés sur les feuilles : les trichomes pelletés et les trichomes capités.

La distinction morphologique n'est pas équivoque puisque les trichomes capités sont constitués de 1 à 4 cellules horizontales et surmontent une cellule de pied et une cellule basale alors que les trichomes pelletés possèdent entre 4 et 18 cellules aplaties horizontales et surmontant une cellule de pied et une cellule basale. Les données développementales sur les trichomes sécréteurs ne sont pas encore très précises surtout au niveau des mécanismes moléculaires de détermination/différentiation. Très souvent le trichome d'*Arabidopsis thaliana* est utilisé comme modèle pour le développement des trichomes.

### **B. Développement du trichome d'*Arabidopsis thaliana***

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les trichomes sont unicellulaires (Figure 1A). Ils se développent sur la plupart des organes aériens incluant les feuilles, les tiges. Sur les feuilles de rosettes, ils ont une forme caractéristique à trois branches principalement. De nombreux mutants glabres ou aux trichomes anormaux ont été identifiés. De plus, les outils génétiques et moléculaires développés chez *Arabidopsis thaliana*, ont fait de ces cellules un modèle d'étude de la différenciation cellulaire (Hulskamp, 2004). Ainsi, plus de trente loci sont actuellement connus pour être impliqués dans l'initiation, la répartition spatiale et la morphogenèse du trichome (Hulskamp *et al.*, 1994 ; Szymanski *et al.*, 2000).

#### **1. Initiation des trichomes**

Les trichomes commencent à se différencier très tôt au cours du développement de la feuille quand elle atteint une taille d'environ 100µm (Larkin *et al.*, 1996). D'un point de vue spatial, l'initiation débute préférentiellement sur la partie proximale de la feuille (Schnittger *et al.*, 1999). L'initiation des trichomes est déclenchée par un complexe activateur formé de quatre protéines nucléaires : GLABROUS1 (GL1) (Oppenheimer *et al.*, 1991), GLABRA3 (GL3) et ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003), et TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) (Walker *et al.*, 1999). Ces protéines appartiennent à trois familles distinctes : les facteurs R2R3-MYB (**GL1**), des protéines **bHLH** (basic helix-loop-helix ; GL2 et GL3) et des protéines à domaine **WD40** (**TTG**). L'initiation se caractérise par l'induction de trois cycles d'endoréplication conduisant à une ploïdie de 16C. La cellule émerge de l'épiderme et un premier point de branchement apparaît. Ensuite, un quatrième cycle d'endoreplication a lieu parallèlement à une expansion cellulaire et à la formation d'une 3<sup>ème</sup> branche.

Ainsi, le trichome mature possède trois branches et un contenu en ADN de 32C (Hulskamp *et al.*, 1994). Il a été montré que les gènes *GL1* et *TTG1* jouaient un rôle dans l'initiation alors que *GL3* a une action dans l'initiation et le 4<sup>ème</sup> cycle d'endoréplication (Hulskamp *et al.*, 1994) (Figure 3). Cette initiation est dépendante des hormones. En effet, les gibbérellines sont aussi impliquées dans l'initiation des trichomes tecteurs d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi, des plantes traitées avec l'uniconazol ou le paclobutrazol, des inhibiteurs de la biosynthèse des GA (Nambara *et al.*, 1991), présentent une réduction dose-dépendante du nombre de trichomes. L'effet peut être contrecarré par des GA exogènes (Chien et Sussex, 1996 ; Perazza *et al.*, 1998). Cet effet a été confirmé par le traitement du mutant glabre *gal-3* par des GA exogènes (Chien et Sussex, 1996 ; Tefler *et al.*, 1997). Perazza *et al.*, (1998) ont montré que les rôles des GA dans l'initiation passent par l'activation transcriptionnelle de *GL1*.

A l'inverse des mutations du gène *SPINDLY* entraînent une réponse constitutive aux GA. Au niveau des trichomes, ceci se traduit par une augmentation de leur nombre ainsi que du nombre de branches (Jacobsen et Olszewski 1993, Perazza *et al.*, 1999).

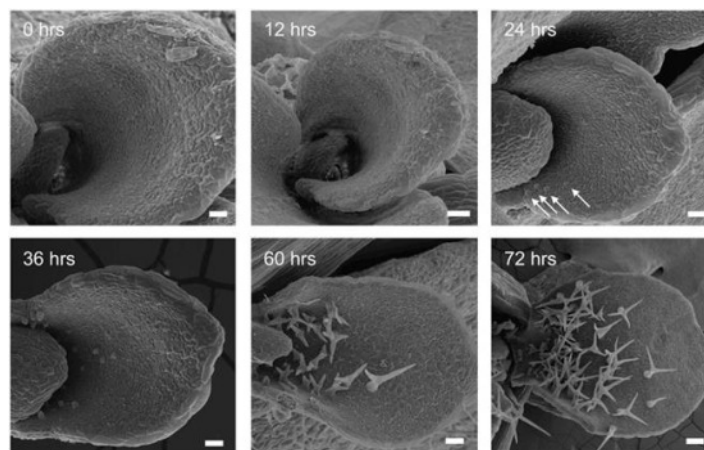
### 2. Morphogenèse des trichomes

D'autres régulateurs interviennent dans la différenciation du trichome au stade de morphogenèse. En effet, les complexes GL1-GL3-TTG ou GL1-EGL3-TTG sont des activateurs directs des gènes *GL2* et *TTG2* (Ishida *et al.*, 2007; Morohashi *et al.*, 2007; Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008) (Figure 3). La protéine GL2 va agir dans l'élongation du trichome hors du plan de la feuille. La protéine TTG2 est indispensable au développement correct du trichome (Johnson *et al.*, 2002) bien que son rôle précis ne soit pas connu. Les composants du cytosquelette notamment l'actine et les microtubules semblent indispensables à la structuration physique du trichome (Mathur et Chua, 2000). De plus, les gènes *ZWICHEL* (*ZWI*) codant une protéine de type kinésine et *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) et *SPYKE1* (*SPK1*) sont également impliqués dans l'organisation du cytosquelette. En effet, la mutation d'un de ces gènes conduit à la formation de trichomes à deux branches essentiellement (Oppenheimer *et al.*, 1997 ; Folkers *et al.*, 2002 ; Qiu *et al.*, 2002).

### 3. Inhibition latérale de la formation des trichomes

L'espacement des trichomes sur l'épiderme résulte d'un mécanisme d'inhibition latérale entre cellule.

Quatre facteurs MYB homologues TRIPTYCHON (TRY), CAPRICE (CPC), ENHANCER OF TRY et CPC1 (ETC1) et ETC2 sont des répresseurs de l'initiation des trichomes (Wada *et al.*, 1997 ; Schellmann *et al.*, 2002 ; Kirik *et al.*, 2004). La surexpression de chacun de ces quatre facteurs entraîne un phénotype glabre. L'expression de *CPC* et *ETC1* est directement activée par GL1-GL3/EGL3-TTG tandis que la régulation de *TRY* et *ETC2* semble dépendre d'une autre voie encore non définie (Morohashi *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2008). L'absence de domaine activateur de transcription dans ces protéines MYB (TRY, CPC, ENHANCER OF TRY, ETC1 et ETC2) suggèrent qu'elles interviendraient en tant que répresseurs de la transcription (Wada *et al.*, 1997 ; Schellmann *et al.*, 2002 ; Kirik *et al.*, 2004). Le modèle actuel de l'inhibition latérale des trichomes suggèrent que ces répresseurs MYB seraient activés dans les cellules ayant débutées une différenciation en trichome. Ces répresseurs vont alors migrer dans les cellules voisines via les plasmodesmes pour empêcher la formation du complexe GL1-GL3/EGL3-TTG. Ceci est compatible avec la capacité de CPC à se déplacer dans les cellules épidermiques d'une feuille (Zhao *et al.*, 2008).



**Figure 3: Initiation des trichomes du mutant *gl3/egl3* après complémentation par p35S::GL3-GR. Les plantules d'*A.thaliana* ont traitées à la dexaméthasone. Le développement des trichomes tecteurs est observé dès 24h après traitement (Morohashi *et al.*, 2007).**

### **C. Développement d'une glande peltée de *M. x piperita***

Les étapes développementales sont bien connues chez *M. x piperita* (Amelunxen *et al.*, 1965 ; Turner *et al.*, 2000b) (Figure 4C). La glande peltée de *M. x piperita* passe par trois stades de développement : le stade pré-sécrétoire, le stade mature de sécrétion et le stade post-sécrétoire. (Turner *et al.*, 2000b) (Figure 4A, B et C).

## 1. La phase pré-sécrétoire

Dès l'entrée du trichome sécréteur dans cette phase, il entamera son développement. Chez les Lamiacées, cette phase se caractérise par une cellule du protoderme possédant un cytoplasme dense, un noyau plus large qu'une cellule épidermique normale et parfois l'apparition de plastides (Ascensao et Pais, 1997). Dès ce stade, il est probable qu'un mécanisme d'inhibition latérale se mette en place grâce au produit du gène *MIXTA* (facteur MYB). En effet, Glover *et al.*, (1998) ont montré qu'une surexpression du gène *MIXTA* chez *N.tabacum* provoque le développement de trichomes glandulaires sur les carpelles et les pétales.

## 2. Phase demi-sécrétoire

La cellule basale d'un trichome sécréteur va augmenter son volume pour se diviser d'abord afin de former la cellule du pied (ou queue) puis la cellule de tête. Cette dernière peut, à son tour subir plusieurs divisions avant de former la tête sécrétrice (Werker et Fahn, 1981). La glande est composée de huit disques cellulaires apicaux au stade intermédiaire de sécrétion (Figure 4).

## 3. Phase sécrétoire et post sécrétoire

Pendant cette phase de sécrétion, la glande relâche vers l'extérieur le composé volatil avant de passer au stade post sécrétoire au cours duquel la cavité subcuticulaire devient une zone de stockage de lipides (Figure 4E et F).

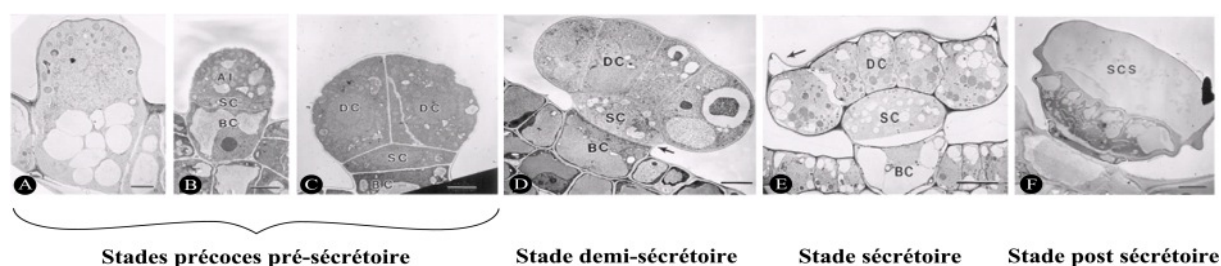


Figure 4 : Stades de développement d'une glande peltée de *M. x piperita* (adaptée de Turner *et al.* 2000 b). A, trichome initial unicellulaire cryofixé dont la base est vacuolisée (BC), l'apex contient le noyau, les mitochondries et les plastides. B, trichome initial après divisions périclines, différenciation en cellule pédonculaire (SC) et en disque cellulaire apical (AI). C, Trichome pelté en développement avec quatre disques cellulaires apicaux (DC). D, Coupe transversale d'une glande peltée avec huit disques cellulaires apicaux au stade intermédiaire de sécrétion. E, Coupe d'une glande peltée au stade de sécrétion. F, Coupe de glande peltée au stade post-sécrétoire avec une cavité subcuticulaire de stockage de lipides (SCS).

Au niveau du contrôle moléculaire du développement des trichomes sécréteurs, des études ont été entreprises chez *Mentha.piperita* par Mauriat (2005 ; Thèse). Il a été démontré que le nombre de glandes peltées était significativement augmenté sur la face abaxiale des feuilles traitées au paclobutrazol. En revanche, une surexpression de *GLI* chez *Nicotiana* ne perturbe pas la distribution des trichomes et le gène *MIXTA* ne complémente pas le mutant *gli* d'*Arabidopsis thaliana*. Un facteur de transcription Myb (GhMyb25) des fibres du coton a été surexprimé chez le tabac résultant en une augmentation des longs trichomes glandulaires (Wu *et al.*, 2006).

## ***II. Les trichomes glandulaires : siège de synthèse de produits de sécrétion***

Le lien entre la présence des trichomes glandulaires et l'accumulation des huiles essentielles a été noté à partir de descriptions anatomiques (Uphof, 1962). Malgré la diversité des structures sécrétrices, il a été montré que seules les cellules de tête étaient sécrétrices. Selon les familles de trichomes, ces cellules de tête sont recouvertes d'une cuticule imperméable. Cependant, seuls les trichomes possédant, une cuticule poreuse, un espace subcuticulaire ou une rupture de la cuticule, peuvent assurer une sécrétion/libération des molécules volatiles (Werker, 1993). Chez, les Lamiacées, les trichomes sont recouverts d'une cuticule. Très souvent, lors de la maturation des trichomes, celle-ci se détache de la paroi pecto-cellulosique et l'huile essentielle s'accumule dans l'espace sous-cuticulaire ainsi généré.

Les composés sont relâchés lors de la rupture de la cuticule. Chez la menthe, le taux d'évaporation des composés à travers la cuticule des glandes peltées est très faible (moins de 5% sur une période de 6 mois) (Gershenzon *et al.*, 2000). Chez les Solanacées, les sécrétions sont directement émises dans l'environnement et la partie la plus visqueuse coule le long du pied du trichome notamment pour contrer l'attaque d'un prédateur. Au niveau ultrastructural, les glandes peltées productrices de composés terpéniques se caractérisent par une prolifération intense du réticulum endoplasmique et par un très grand nombre de leucoplastes (Ascensao *et al.*, 1997 ; Turner *et al.*, 2000a). Chez *Leonotis leonurus*, les trichomes peltés sécrètent une oléorésine contenant des terpènes et des flavonoïdes aglycones (Ascensao *et al.*, 1997) alors que les trichomes capités sécrètent des protéines et des polysaccharides acides et neutres, en plus des terpènes et flavonoïdes aglycones (Ascensao et Pais, 1998).

### ***A. Les principaux Composés Organiques Volatils (VOCs)***

Les plantes produisent *via* les trichomes des molécules à faible poids moléculaire. Ces molécules font partie de la classe des métabolites secondaires (Pichersky *et al.*, 2000). Plus de 1% d'entre elles sont des molécules lipophiles avec un point de fusion bas et dont le passage à l'état gazeux est provoqué par une forte pression à température ambiante, on parlera alors de VOC (Volatiles Organics Compounds). Généralement, ces VOCs sont ordonnés en trois catégories :

#### **1. Les dérivés d'acide gras**

Ils proviennent de la coupure des acides gras par des lipoxygénases. Ils sont synthétisés abondamment par les feuilles et les sépales, souvent à la suite d'une blessure, c'est pourquoi ils sont aussi appelés « green leaf volatiles ». Ils jouent un rôle dans la défense directe. Certains sont présents en quantités très importantes chez certaines roses. C'est le cas du 2-phényléthanol, qui a une odeur typique de rose dite odeur rosée. D'autres, comme le DMT (3,5-diméthoxytoluène) et le TMB (1,3,5-triméthoxybenzène), donnent aux roses qui en possèdent en grande quantités une odeur qualifiée d'odeur de thé. Dans les deux cas, on trouvera une diversité de cellules sécrétrices importante.

#### **2. Les dérivés d'acides aminés**

Le métabolisme des composés dérivent du même précurseur, la L-phénylalanine. Classiquement, les composés aromatiques sont divisés en deux catégories (Knudsen *et al.*, 1993)

##### *Les phénylpropanoïdes*

La plupart des phénylpropanoïdes ne sont pas volatils. Néanmoins, les phénylpropanoïdes qui sont réduits au niveau du carbone 9 (en aldéhyde, alcool ou alcane/alcène) et/ou présentent des additions alkyl sur les groupes hydroxyls du noyau benzénique ou sur le groupe carboxyl sont volatils. On peut citer l'eugénol et le méthyleugénol.

##### *Les benzénoïdes*

Ils sont dérivés des phénylpropanoïdes par la coupure des carbones C8-C9. Le mécanisme exact de cette coupure n'est pas complètement élucidé (Boatright *et al.*, 2004).

Ils forment une branche latérale de la voie générale des phénylpropanoïdes, à partir de l'acide trans-cinnamique. Le benzylalcool ainsi que le 2-phényléthanol et leurs dérivés sont très présents dans les parfums floraux (Knudsen et Tollsten, 1993).

### **3. Les terpènes**

Ces composés dérivent tous d'un même précurseur, l'isoprène. On trouve notamment des alcools monoterpéniques comme le géraniol, le citronellol, le nérol et leurs dérivés. Les alcools monoterpéniques donnent aux fleurs une odeur typique de rose. On note également la présence de sesquiterpènes (correspond à une molécule d'isoprène et demie) comme le germacrène. Des dérivés terpéniques peuvent être présents en quantité infime mais participer à la fragrance d'une fleur grâce à leur pouvoir olfactif élevé (Ohloff et Demole, 1987). C'est le cas des cétones de rose comme le dihydro- $\beta$ -ionol. Concernant la lavande, on constate que son huile essentielle est constituée de plus de 300 composants dont 95% sont des terpènes (Ohloff, 1995).

#### ***B. Métabolisme des terpènes : composés majoritaires des trichomes***

Le nom terpène provient du fait que le premier terpénoïde a été isolé de la turpentine (turpentin en allemand). Un premier groupe comporte les plus petites molécules terpéniques constituées d'une molécule d'isoprène connue sous le nom d'hémiterpène. Vient ensuite le deuxième groupe issu de la condensation de deux molécules d'isoprènes.

Ce sont les monoterpènes connus pour être des constituants des parfums de fleurs et des huiles essentielles. Les sesquiterpènes (15C) dérivent de la condensation de 3 unités d'isoprènes. Beaucoup de sesquiterpène agissent comme des phytoalexines ou des agents antimicrobiens. Par ailleurs l'acide abscissique est une hormone de type sesquiterpène bien qu'elle soit issue du clivage d'une molécule de caroténoïdes. Les diterpènes contenant 20 C (quatre unités C5) incluent le phytol, les hormones gibbérellines, ou encore les résines de conifères. Le taxol (anticancéreux majeur) fait parti de ce groupe. Quant aux polyterpènes (plus de 40 atomes de carbones), ils rentrent dans la constitution de composés comme le latex. Les tétraterpènes et diterpènes sont synthétisés dans le plaste. Quelque soit la molécule terpénique, elle dérive toujours d'une molécule unique à cinq atomes de carbone, l'isopentényl diphosphate, ou IPP, et de son isomère le diméthylallyl diphosphate, ou DMAPP.



Les quatre étapes de la synthèse des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes sont, la synthèse de l'IPP et son isomérisation en DMAPP, la condensation de ces molécules par les prényltransférases pour donner le GPP (géranyl diphosphate), le FPP (farnésyl diphosphate) et le GGPP (géranylgéranyl diphosphate), précurseurs des terpènes. Dans une quatrième étape, les prényl diphosphates subissent des réactions de cyclisation catalysées par les terpènes synthases (TPS). Les squelettes terpéniques sont remaniés par des enzymes de maturation des terpènes pour produire des centaines de composés différents. (Figure 5).

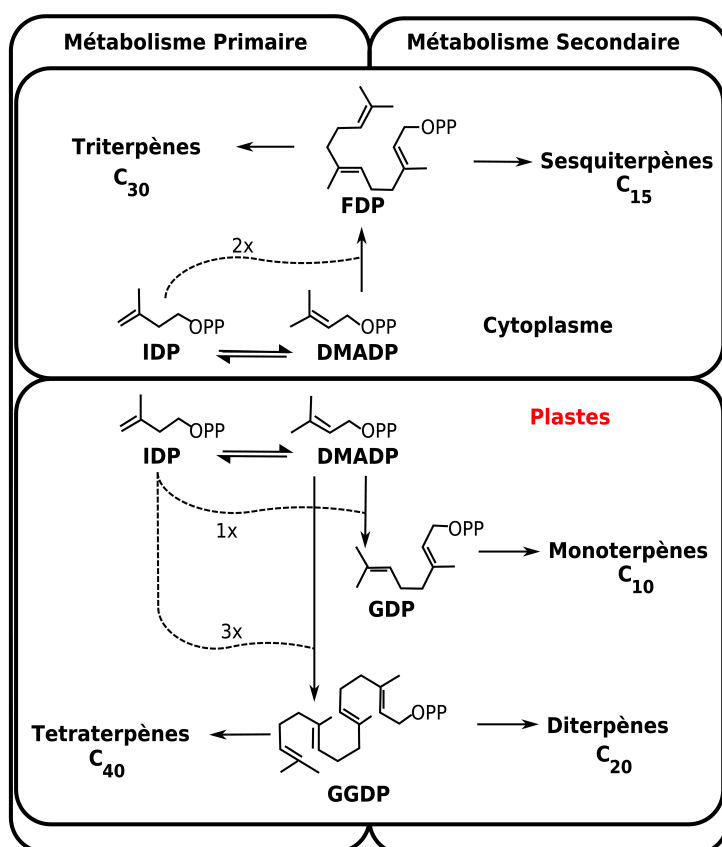


Figure 5: Compartimentation du métabolisme des terpènes dans la cellule végétale.

### 1. La biosynthèse des précurseurs, l'IPP et le DMAPP

L'IPP et le DMAPP peuvent être synthétisés par deux voies distinctes : la voie dite classique du mévalonate/acétate, ou voie MEV qui se déroule dans le cytoplasme ou les mitochondries, et la voie dite alternative indépendante du mévalonate, ou voie du 2C-méthyl- D-érythritol 4-phosphate) qui a lieu dans les plastes. Il est admis que la voie MEP plastidiale de synthèse de l'IPP est à l'origine de la synthèse du GPP et GGPP, tandis que le FPP dérive de l'IPP synthétisé par la voie MEV cytoplasmique ou mitochondriale (Figure 6).

### a) La voie MEV

Le rôle du mévalonate comme intermédiaire spécifique de la synthèse de l'IPP a été démontré dans de très nombreuses études chez les mammifères et les champignons, de même que chez les plantes et les archéobactéries. De ce fait, pendant de nombreuses années, on a pensé que cette voie de biosynthèse était la seule voie de biosynthèse de l'IPP. La voie MEV a été largement décrite par de nombreux auteurs (pour revue, voir Lichtenthaler *et al.*, 1997). Elle met en œuvre la condensation de trois unités d'acétyl-CoA pour former le 3- hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (ou HMG-CoA) qui, après réduction par deux molécules de NADPH, forme l'acide mévalonique (MEV). Le MEV est phosphorylé par la MEV kinase (MVK) pour donner le 5-phosphomévalonate. Ce composé est alors phosphorylé par la MVP kinase (PMK) pour donner le 5-diphosphomévalonate, décarboxylé par la MVPP décarboxylase (PMD) pour donner l'IPP (Rodriguez-Concepcion et Boronat, 2002) (Figure 6).

### b) La voie du 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

Des expériences de marquage radioactif ont montré que chez certains organismes, comme les eubactéries, les algues vertes et dans les chloroplastes des plantes supérieures, la formation de l'IPP passe par une voie alternative indépendante du mévalonate (Kuzuyama *et al.*, 1998). Cette voie alternative de biosynthèse de l'IPP a été découverte pour la première fois par Rohmer *et al.*, en 1993 chez *E. coli*. Elle a été nommée voie MEP car elle met en jeu le 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate. Les eubactéries ne possèdent pas la voie MEV et la synthèse de l'IPP se fait via la voie MEP. L'identification des gènes impliqués dans cette voie a été réalisée grâce à des expériences utilisant des mutants pour la voie MEP d'*E.coli*. Aujourd'hui, toutes les étapes de cette voie sont caractérisées chez cette bactérie. L'étape initiale de la voie MEP est la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate. Cette réaction est catalysée par la protéine DXP synthase (ou DXS). Pour la deuxième étape, Rohmer *et al.* (1996) ont proposé une réaction de réarrangement intramoléculaire du DXP, suivie d'une réaction de réduction qui conduit au MEP.

L'enzyme responsable de cette étape est la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ou DXR. Il est à noter que le DXP est non seulement un intermédiaire de la voie MEP mais également un intermédiaire des voies de synthèse de la thiamine, ou vitamine B1 (Julliard et Douce, 1991), et du pyridoxol, ou vitamine B6 (Hill *et al.*, 1989). Ainsi, la réaction catalysée par la DXR est la première étape spécifique de la voie conduisant aux terpènes. Le MEP est transformé en 4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol (CDP-ME) en présence de CTP (Rohdich *et al.*, 1999) par l'enzyme CDP-ME synthase (CMS). Le CDP-ME est ensuite phosphorylé sur le carbone 2 pour donner le 4 diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol 2-phosphate (CDP-MEP) (Lüttgen *et al.*, 2000). Cette réaction est catalysée par l'enzyme CDP-ME kinase (CMK). L'étude cristallographique de la CMK a permis de définir les sites impliqués dans la réaction et pourrait être nécessaire à réalisation d'agents anti-microbiens (Miallau *et al.*, 2003). L'étape suivante, catalysée par l'enzyme HMBPP synthase ou HDS, convertit le ME-cPP en 1-hydroxy-2-méthyl-2E-butényl 4-diphosphate (HMBPP) (Hecht *et al.*, 2001). La dernière étape de la voie MEP de biosynthèse de l'IPP est la formation de l'IPP et du DMAPP par conversion du HMBPP. Cette réaction est catalysée par la protéine IDS (IPP synthase) qui est capable de produire, à partir de HMBPP, de l'IPP et du DMAPP dans un rapport de 5 : 1, respectivement (Altincicek *et al.*, 2002). Avant l'obtention de ces résultats, il était admis, à cause de la présence de l'IPP isomérase, que le DMAPP était produit uniquement à partir de l'IPP, par une réaction d'isomérisation. Le fait que la protéine IDS soit capable de produire une certaine quantité de DMAPP, en plus de l'IPP, explique pourquoi l'absence d'IPP isomérase n'est pas létale pour les cellules. Le séquençage du génome de différents microorganismes a révélé une organisation «en cluster» des gènes impliqués d'une part dans la voie MVA et d'autre part dans la voie MEP de biosynthèse de l'IPP. Cependant, il n'existe pas de «cluster mixte», c'est-à-dire regroupant des gènes des deux voies (Hecht *et al.*, 2001). Certains gènes de la voie MEP ont été isolés et caractérisés chez un grand nombre de plantes, néanmoins tous les orthologues végétaux n'ont pas encore été identifiés.

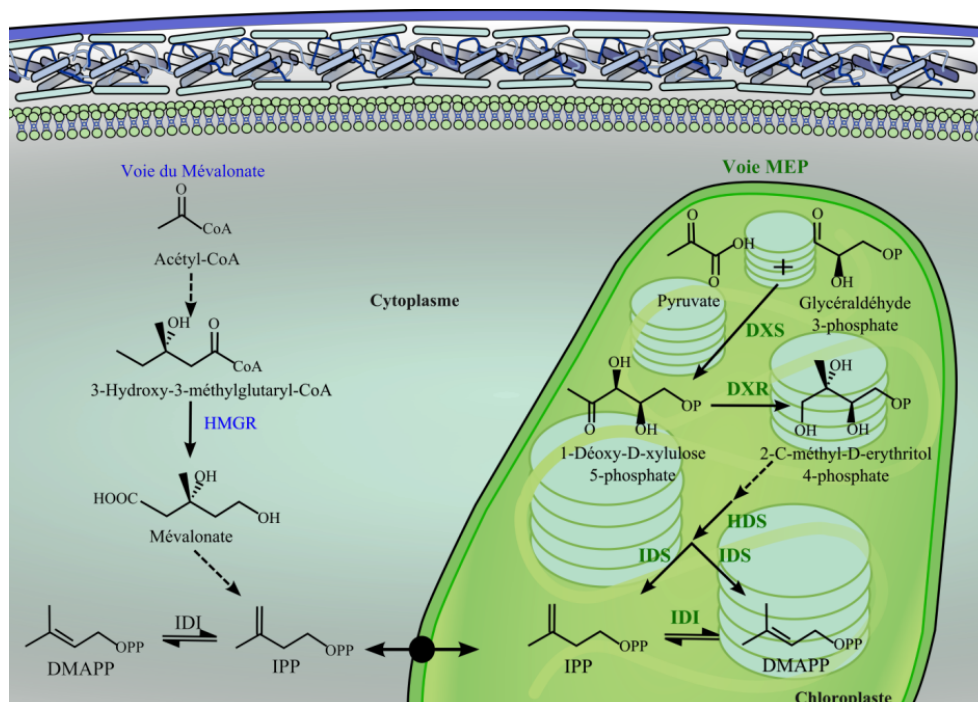


Figure 6: Compartimentation de la synthèse de l'IPP et du DMAPP, par la voie cytoplasmique (Voie MEV). HMGR : 3-Hydroxy,3-méthylglutaryl coenzymeA réductase ; IDI : isopentenyl diphosphate isomérase. Par voie chloroplastique (voie MEP). DXS : 1-déoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase ; DXR, 1-déoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomérase ; HDS : hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate synthase. IDS : isopentenyl diphosphate diméthylallyl diphosphate synthase. (Adapté de Roberts, 2007).

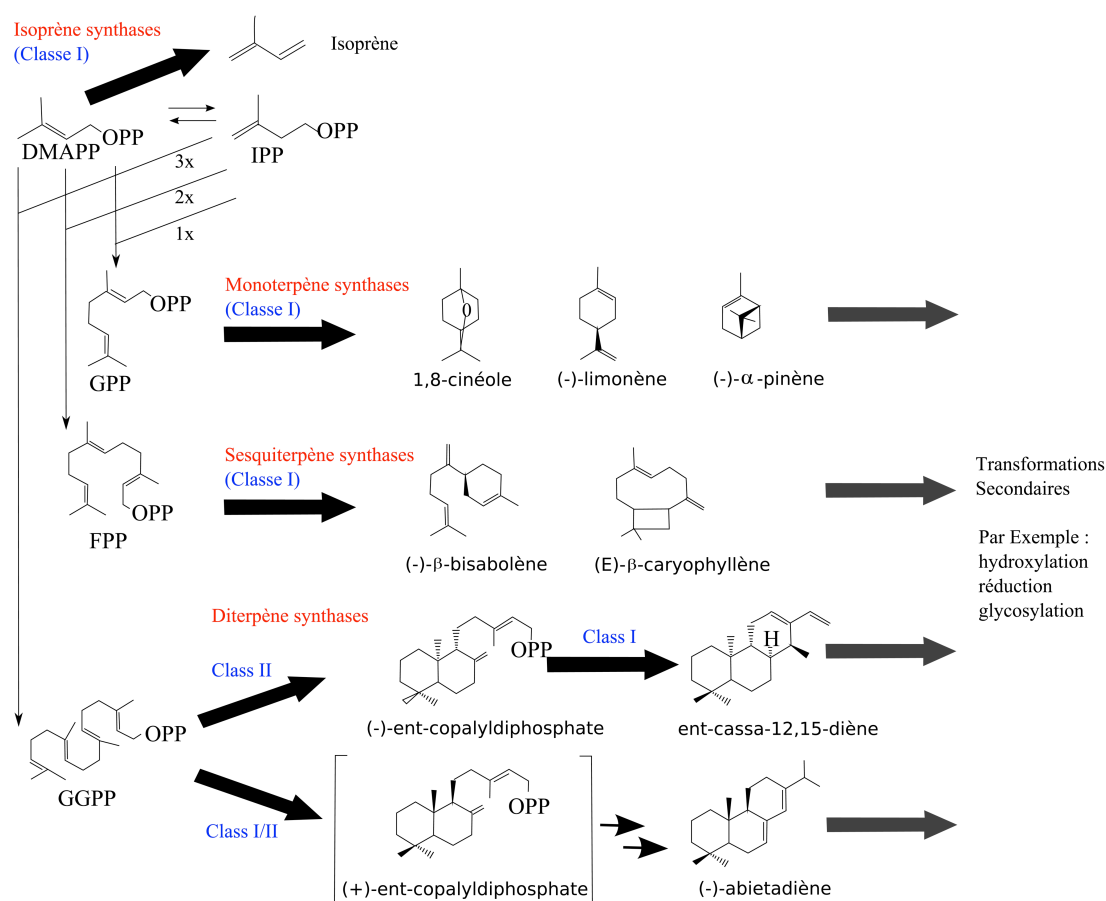
## 2. Condensation : naissance des terpènes

Les prényltransférases catalysent la réaction de condensation de l'IPP avec son substrat allylique tel que le DMAPP, le GPP ou d'autres diphosphates d'isoprénoïdes à longue chaîne carbonée donnant naissance aux précurseurs de terpènes (Clastre *et al.*, 1993 ; Sommer *et al.*, 1995). Il existe trois types de prényltransférases (Figure 7) :

- La *géranyl diphosphate synthase* (GPPS) permet d'obtenir un squelette en C<sub>10</sub>, le GPP, précurseur des monoterpènes qui seront synthétisés dans les plastes.
- La *farnésyl diphosphate synthase* (FPPS) assure la formation d'un squelette en C<sub>15</sub>, le FPP précurseur des sesquiterpènes. Deux molécules de FPP peuvent aussi se condenser pour donner des triterpènes en C<sub>30</sub> (brassinostéroïdes, phytostérol...). Que ce soient les sesquiterpènes ou triterpènes, ils seront synthétisés dans le cytosol.
- La *géranylgéranyl diphosphate synthase* (GGPPS) donne un squelette en C<sub>20</sub>, le GGPP, précurseur des diterpènes (gibbérélines, tocophérol...) ; deux molécules de GGPP peuvent aussi se condenser pour donner des tétraterpènes en C<sub>40</sub> (caroténoïdes).

### **a) Les terpènes synthases**

Les séquences protéiques de ces enzymes présentent des caractéristiques communes. Ainsi les protéines non-matures possèdent toutes à l'extrémité N-terminale une séquence d'adressage vers le plaste. Elles ont la particularité de toutes posséder deux domaines qui les caractérisent. Le domaine N-terminal porte le nom de « glycosyl-hydrolase-like domain » et le domaine C-terminal contient le site catalytique. Par ailleurs, elles se subdivisent en trois grandes classes : les enzymes de classe I qui possèdent un motif consensus DDXXD en C-terminal, les enzymes de classe II qui possèdent un motif consensus (D/E)XD(D/N) en N-terminal (Prisic *et al.*, 2004). Les enzymes de ces deux classes agissent séquentiellement pour générer des squelettes carbonés de type labdanes et sont généralement retrouvées dans le métabolisme primaire mais interviennent aussi dans le métabolisme secondaire chez le riz pour la synthèse du cassadiène. D'autres diterpènes synthases du métabolisme secondaire des gymnospermes possèdent les deux motifs et sont donc bi-fonctionnelles avec deux sites catalytiques. Cependant ces enzymes sont répertoriées dans la classe I (Figure 7). Que ce soient les enzymes de classe I ou de classe II, elles sont toutes caractérisées par une séquence interne au domaine N-terminal appelé CDIS de 215 acides aminés. Ce domaine est localisé entre le peptide signal et le glycosyl-hydroxylase-like domain (Trapp et Croteau, 2001).



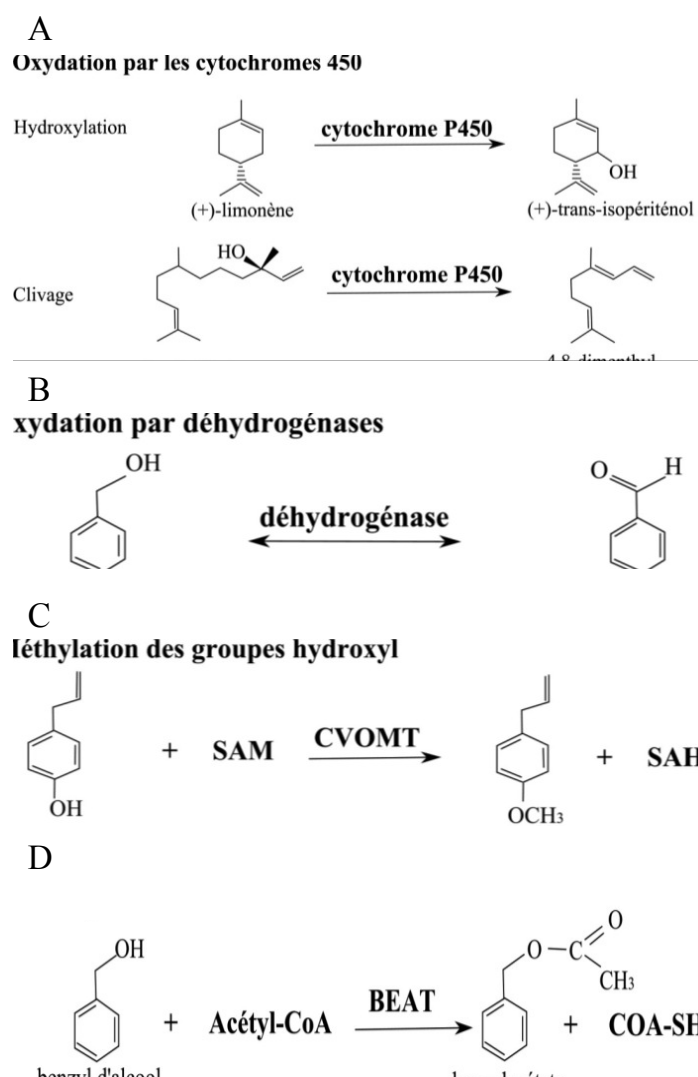
**Figure 7 : Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes dans les plantes et les différentes classes de terpènes synthase chez les gymnospermes et angiospermes. DMADP, diméthylallyldiphosphate; FDP, farnésyldiphosphate; GDP, géranyl diphosphate; GGDP, géranylgeranyl diphosphate; IDP, isopentényldiphosphate; MEP, méthylerythritol phosphate; MEV, mévalonate.**

Chez les angiospermes, les enzymes de classe III possèdent le domaine DDXXD en C-terminal mais pas le CDIS des classes I et II. Par ailleurs, ces enzymes n'agissent qu'en une seule étape réactionnelle (Trapp et Croteau, 2001). Ainsi la casbène synthase est une diterpène synthase de classe III (Mau et West, 1994). Une analyse de la séquence du génome d'*Arabidopsis thaliana* a révélé 21 séquences répondant aux critères des diterpènes synthases de classe III (Aubourg *et al.*, 2002). Cinq séquences sur les 21 possèdent le motif (D/E)EDD, ce qui les rapproche des diterpènes synthases de type I (Aubourg *et al.*, 2002). Ces enzymes sont susceptibles de produire des molécules de types labdanoïdes en une seule étape (Figure 7). La grande variété de métabolites terpéniques dans le monde végétal est due à l'évolution de la superfamille des terpènes synthases. A ce jour, plus d'une centaine de gènes sont connus pour coder ces enzymes. Récemment, des analyses phylogénétiques des séquences des TPS de *Picea abies* ont été comparées à celles d'autres gymnospermes et angiospermes.

Cette étude a confirmé que les TPS de gymnospermes forment une famille distincte des angiospermes (Martin *et al.*, 2004). Cependant, l'analyse des introns (taille, nombre, place) et des exons a permis d'établir un modèle d'évolution des gènes de TPS. Cette dernière montre que toutes les TPS de plantes proviennent d'une TPS ancestrale unique impliquée dans le métabolisme primaire (Croteau *et al.*, 2001). Des analyses de phylogénie entre les différents gènes de *TPS* produisant des métabolites secondaires chez les angiospermes et les gymnospermes ont été faites. La classification montre que les TPS peuvent être subdivisées en trois sous familles, désignées *Tpsa* (sesquiterpènes et diterpènes synthases d'angiospermes), *Tpsb* (monoterpènes synthases d'angiospermes de la famille des Lamiaceae) et *Tpsd* (11 monoterpènes terpènes synthases de gymnospermes, sesquiterpènes et diterpènes synthases) (Bohlmann *et al.*, 1998). Une nouvelle classification incluant de nouveaux gènes a été établie. Elle se base sur le nombre d'introns, d'exons mais également sur la taille et de la présence ou non d'introns. Ces comparaisons génomiques indiquent que les gènes *Tps* se regroupent en trois classes, de type I, II et de type III (Figure 7). Les TPS d'angiospermes se répartissent entre le groupe I (terpènes synthases du métabolisme primaire) et le groupe III (mono-, di- et sesquiterpènes synthases du métabolisme secondaires) (Trapp et Croteau, 2001). Toutes les TPS sont assez similaires dans leurs propriétés physiques et chimiques : en effet, elles nécessitent la présence d'un ion métallique divalent comme cofacteur de la catalyse, et toutes opèrent suivant des mécanismes électrophiles inhabituels (Trapp et Croteau, 2001b). Des réactions carbocationiques sont exclusivement réalisées par les TPS telles que la cyclisation, les réarrangements et autres terminaisons d'étapes, faisant d'elles une classe d'enzyme unique. En effet, cette grande variation dans le mécanisme commun aux angiospermes et gymnospermes rend possible la production de tous les squelettes, isomères et dérivés terpéniques constituant la grande diversité des terpènes. Chez la menthe, de 30 à 40 produits cycliques sont produits à partir du GGP par autant de monoterpènes synthases (Croteau *et al.*, 1990). A ce jour, plusieurs gènes de diterpènes synthases ont été clonés et leurs fonctions confirmées. Il s'agit de la taxadiène synthase (Wildung et Croteau, 1996), l'abietadiène synthase (Peters *et al.*, 2000), la casbène synthase (Schepmann *et al.*, 2001) et la cembratriène-ol synthase (Wang et Wagner, 2003). D'autres gènes de diterpènes synthases sont en cours de caractérisation chez le riz ou le tabac comme la cis-abiérol synthase.

## b) Modifications secondaires des terpènes

Pour aboutir aux produits finaux, les squelettes primaires doivent subir d'autres modifications mettant en jeu des réactions d'hydroxylation, d'oxydation, de réduction de double liaison, d'acylation, de glycosylation ou de méthylation (Lange et Croteau, 1999a). Les enzymes impliquées dans cette maturation sont très diverses. Il semblerait que seuls les composés peu ou complètement volatils vont subir ces modifications.



**Figure 8 : Modifications secondaires des terpènes :**

**A : Hydroxylation et clivage par le cytochrome P450, B : Oxydation par une déshydrogénase, C : Méthylation par une chavicol méthyl-transférase. D : Acylation par une Benzyl-alcool-méthyltransférase (Dudareva *et al.*, 2004).**



### ***- L'oxydation par les cytochromes P450***

Le squelette basique des monoterpènes et sesquiterpènes est souvent modifié par oxydation (Figure 8A). Par exemple, pour la synthèse du menthol l'enzyme cytochrome P450 catalyse l'oxydation du limonène en trans-isopéritenol (Lupien *et al.*, 1999). Ce type d'enzyme est aussi impliqué dans les réactions de clivage de terpènes notamment lors des blessures afin d'aboutir à l'émission de composés volatils (Gershenzon *et al.*, 2000). Ces enzymes P450 rentrent aussi dans le métabolisme des composés volatils issus d'acides gras. Ainsi les enzymes P450 9-LOX et 13-LOX peuvent introduire une unité peroxyde dans l'acide linoléique (18:3) (How et Schilmiller, 2002). Le clivage de la chaîne hydrocarbure par l'une des lyases produit deux composés le nonadienal et le 3-cis-hexanal. Ce dernier est un composé volatil émis lorsque la feuille est blessée (Pichersky et Gershenzon, 2002) (Figure 8A).

### ***- Oxydation par les déshydrogénases***

Les oxydoréductases NADP/NAD dépendantes sont des enzymes connues pour être impliquées dans la biosynthèse des composés volatils terpéniques. En effet, le géraniol et le carvéol sont convertis en aldéhyde par des oxydoréductases NADP/NAD dépendantes (Hallahan *et al.*, 1995 ; Bouwmeester *et al.*, 1998) (Figure 8B).

### ***- Méthylation des groupes hydroxyl***

La méthylation de certains terpènes se fait grâce aux méthyltransférases de type I où le donneur du groupe méthyl est le S-adenosyl-L-méthionine (SAM) (Zubieta *et al.*, 2003). Ainsi, c'est une hydroxyméthylation qui permet de faire passer la molécule d'euglénol en méthyleuglénol dans les fleurs de *C.breweri* (Wang *et al.*, 1997) (Figure 8C).

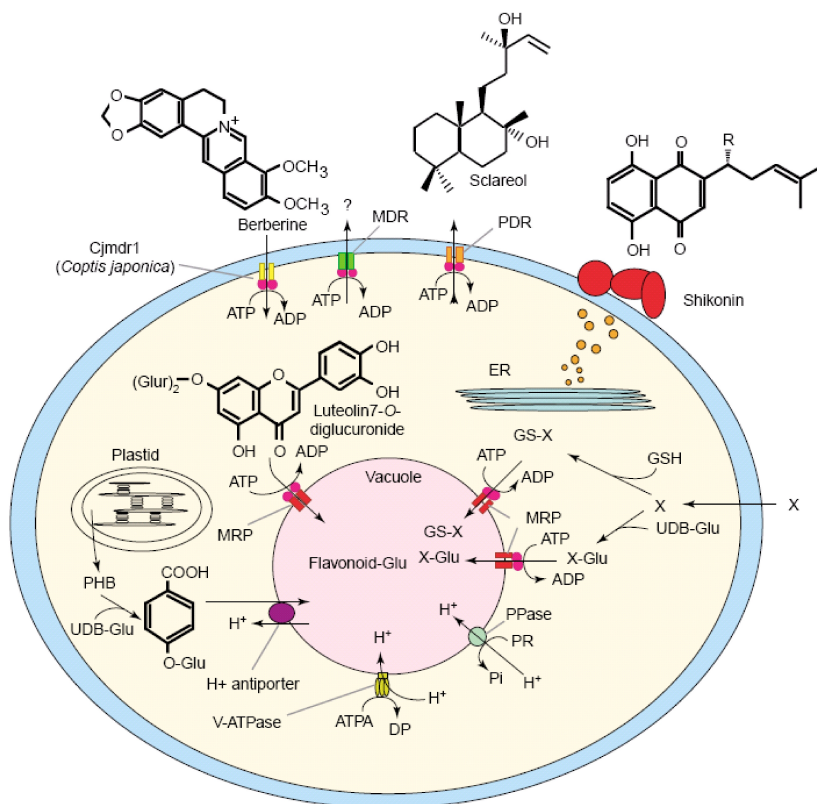
### ***- L'acylation***

Découvertes par St Pierre et De Luca en 2000, les acyltransférases (BAHD) sont impliquées dans la synthèse des composés volatils. Ainsi, les feuilles de *N. tabacum* infectées par le virus de la mosaïque du tabac, synthétisent du benzylbenzoate. Cette molécule est produite par l'action d'une benzyl alcoolbenzoyl-CoA transférase (D'Auria *et al.*, 2002) (Figure 8D).

## C. Mécanismes hypothétiques de sécrétion des VOCs

### 1. La diffusion passive : *Petunia axillaris*

Il existe une corrélation négative entre le point de fusion des VOCs et le ratio entre la concentration des VOCs émis et endogènes (Figure 9). Le point de fusion des VOCs peut atteindre jusqu'à 350°C. Dans les tissus floraux, ces VOCs sont majoritairement sous forme liquide ou en solution. Dans ce cas, si l'émission n'est pas régulée par la physiologie alors elle dépend strictement de la concentration endogène des VOCs et de la pression cellulaire qu'elles y exercent. En se basant sur ces hypothèses, Oyama-Okubo *et al.*, (2005) ont démontré que la synchronisation entre le taux de méthyl-benzoate émis et la concentration endogène de cette molécule permettait d'exclure une régulation physiologique de l'émission de VOCs chez *Petunia axillaris*.



**Figure 9: Modèle des processus de transport des métabolites secondaires dans la cellule de plantes (D'après Yazaki, 2005).**

### 2. Transport ATP-dépendant : *Nicotiana plumbaginifolia*

Les transporteurs ABC sont présents dans toutes les espèces. Chez les plantes, la majorité d'entre eux a été caractérisée dans la membrane vacuolaire (Martinoia *et al.*, 1993) et jouent un rôle fondamental dans la séquestration intracellulaire des toxines (Theodoulou *et al.*, 2000). NpABC1 est un transporteur de *N.plumbaginifolia* localisé dans la membrane plasmique et dont la fonction a été élucidée en 2001 par Jasinsky. L'expression du gène NpABC1 se fait sous l'induction d'un labdane di-terpénique, le scaréol (Jasinsky *et al.*, 2001). En réponse ce transporteur va participer à la sécrétion de scaréol in vivo par des cellules de tabac induites (Jasinsky *et al.*, 2001). Le scaréol est connu pour son activité antifongique chez *N.plumbaginifolia* (Bailey *et al.*, 1975 ; Cutler *et al.*, 1977) (Figure 9).

### 3. Sécrétion granulocrine : *Dianthus caryophyllus* (carnation)

Lors de la sécrétion granulocrine, des vésicules de pinocytose inverse fusionnent avec la membrane plasmique ou sont entourées et détachées du cytoplasme par des invaginations de la membrane. Ces vésicules ont été mises en évidence dans le cytosol des pétales de la carnation (Hudak et Thompson, 1996). Ces complexes lipides-protéines sont essentiellement enrichis en hexanal, trans-2-hexanal, 1-hexanol, 3-hexen-1-ol, et 2-hexanol, composés volatils issus de la voie de la lipoxigénase. Aussi, les VOCs lipidiques des pétales de la carnation sont synthétisés au sein de la membrane plasmique pour être enfermés dans ces complexes lipidiques et relâchés (Hudak et Thompson, 1997). Dans les trichomes sécréteurs, les mécanismes décrits n'ont pas toujours été reliés à l'un ou l'autre des types de sécrétion,

- Diffusion passive chez *Origanum dictamnus* (Bosabalidis et Tsekos, 1982),
- Transport actif du réticulum endoplasmique lisse jusqu'à la membrane plasmique chez la menthe, *Mentha x piperita* (Turner *et al.*, 2000a),
- Bourgeonnement de la membrane plasmique chez *Nepeta racemosa* et *Artemisia annua* (Bourett *et al.*, 1994),
- Sécrétion typiquement granulocrine chez *Prostanthera ovalifolia* par fusion de vésicules à la membrane plasmique (Gersbach, 2002).

## D. Fonction des trichomes

### 1. Rôle physique

La présence physique des trichomes sur les feuilles est indispensable au maintien physiologique de la plante. Certaines espèces de plantes carnivores possèdent un système spécialisé de stockage d'eau basé sur des trichomes foliaires qui absorbent l'eau si l'air est humide. De même, il a été montré qu'une forte densité de trichome s'accompagne rarement d'une perte d'eau (Genz et Martin, 2006). Cependant, le rôle le plus important imputé aux trichomes est la réflexion lumineuse qui permet de réguler la température des feuilles (Martin et Glover, 2007 : pour revue). En effet, les feuilles de *Populus alba* réfléchissent 50% de lumière incidente alors que des feuilles glabres n'en reflètent que 20%. Une autre fonction est la lutte contre les stress biotiques. En effet, les trichomes représentent une barrière physique contre la progression des organismes prédateurs (Richardson *et al.*, 1943). Cette fonction peut être assurée par différentes structures (Tableau I).

Fonctions apparentées	Type de trichomes*	Références
Réduction de la mobilité de l'insecte	ST et GST	Levin, 1973; Johnson, 1975; Kessler, 2002; Kennedy, 2003
Régulation de la température	ST et GST	Johnson, 1975; Dell and McComb, 1978; Ehleringer, 1984
Augmentation de la réflexion de la lumière (+UV)	ST et GST	Ehleringer, 1984
Diminution de la perte d'eau	ST et GST	Ehleringer, 1984
Réduction abrasion mécanique	ST et GST	Uphof, 1962; Johnson, 1975
Protection des organismes phytoplanaires	ST et GST	Beattie and Lindow, 1999
Réduction de l'humidité foliaire	ST et GST	Brewer and Smith, 1997
Réduction de la photosynthèse via la réflexion	ST et GST	Ehleringer, 1984
Dissémination des graines	ST et GST	Uphof, 1962; Werker, 2000
Homéostasie du Ca <sup>++</sup> de l'épiderme	ST et GST	DeSilva <i>et al.</i> , 2000
Collecte du pollène et dissémination	ST et GST	Uphof, 1962; Werker, 2000
Prévention contre l'attaque des insectes et herbivores	GST	Johnson, 1975; Kesley <i>et al.</i> , 1984; Wollenweber, 1984; Bennett and Wallsgrave, 1994; Berenbaum, 1995

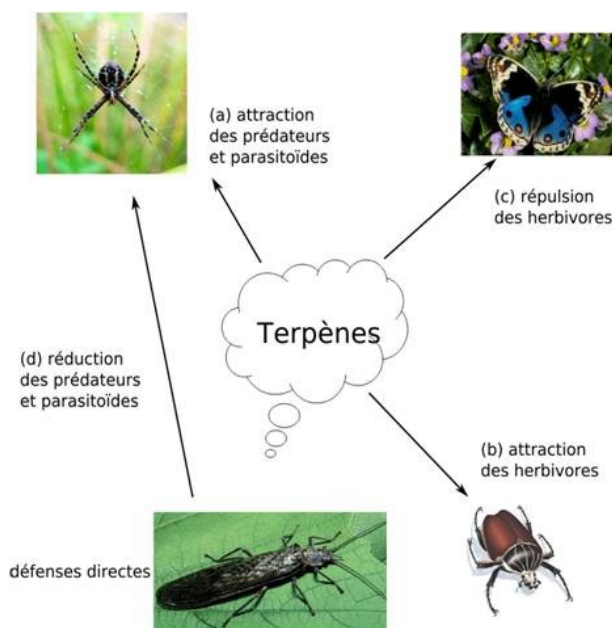
Tableau I : Rôles physiologiques des trichomes.\* ST : trichomes simple, TGS : Trichomes glandulaires.

Enfin, des études ont montré que les TGSs sont capables d'accumuler et de sécréter des éléments ioniques à la surface des glandes salines (Na, Cl) ou métalliques (Ca, Cd, Zn, Mn, Pb, Ni) (Uphof, 1962 ; Salt *et al.*, 1995 ; Kupper *et al.*, 2000 ; Choi *et al.*, 2001 ; Broadhurst *et al.*, 2005). L'évacuation de ces molécules se fait généralement sous forme de cristaux. Ainsi des cristaux de cadmium ont été retrouvés à la surface de trichomes glandulaires longs et courts de tabac après son exposition à une forte concentration de cadmium (Choi *et al.*, 2001).

Les trichomes possèdent cette capacité grâce à la présence, en forte concentration de molécules telles que les phytochélatines et les métallothionéines directement reliées à une forte concentration de glutathion (Alcala *et al.*, 2000).

### 2. Les TGSs et les animaux

Ils sont probablement des éléments essentiels dans la coévolution des plantes avec les parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs (Figure 10). Cette relation existe aussi entre plantes.



**Figure 10 : Interactions entre les plantes, les herbivores et les ennemis des herbivores, sous le contrôle des terpènes volatils (d'après Degenhardt *et al.*, 2003).** (a) une attaque d'herbivores entraîne la libération de terpènes. Ces derniers attirent les prédateurs et les parasites qui pondent sur l'herbivore. Les mêmes terpènes peuvent également affecter d'autres herbivores, aussi bien en les attirant (b) qu'en les repoussant (c). De plus, les caractères impliqués dans la défense indirecte peuvent affecter négativement le succès des prédateurs ou des parasites (d).

Ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (Bottega et Corsi, 2000) (Figure 10).

#### a) La pollinisation

Les fleurs sont connues pour attirer les insectes pollinisateurs. Cette attraction peut se faire *via* la couleur des pétales ou *via* la senteur et donc par l'émission de VOCs (Jones and Reithel, 2001).

Pour ce dernier cas, les démonstrations scientifiques sont relativement peu développées (Pichersky et Gershenzon, 2002). D'une manière générale, le composé volatil émis est spécifique d'un insecte ou d'un groupe d'insectes pollinisateurs. Par exemple, les esters benzéniques, comme le benzylacétate, sont émis par une majorité de fleurs pollinisées par les papillons. La relation entre la nature des composés volatils et l'insecte pollinisateur a été également mise en évidence chez *Cimicifuga simplex*. En effet, deux sous-espèces non odorantes de *C. simplex* sont pollinisées par des bourdons, tandis qu'une troisième émet du méthyl-anthranilate et de l'isoeugénol qui attirent spécifiquement des papillons pollinisateurs (Piechulla et Pott, 2003). Parfois, certaines plantes (orchidées) sont capables d'émettre des composés différents au cours de la pollinisation. Les fleurs d'*O. sphegodes* sont visitées par des abeilles mâles solitaires (*Andrena nigroaenea*) qui confondent la fleur avec la forme du corps de l'abeille femelle. Ajouté à cela, les fleurs émettent des composés alcanes et alcènes (C21-C29) normalement émis par les abeilles femelles réceptives à l'accouplement. Il est surprenant de constater que les fleurs d'*O. sphegodes* produisent et émettent ces composés dans des proportions identiques à celles des abeilles femelles réceptives. Une fois pollinisées, les fleurs vont émettre du farnésyl hexanoate, composé émis par les abeilles non réceptives. Ceci a pour conséquence de repousser les abeilles mâles qui se dirigent vers les fleurs non pollinisées (Ayass *et al.*, 2000). Les composés volatils produits par les fleurs ne sont pas les seuls à attirer les insectes pollinisateurs. En effet, de nombreux terpènes sont produits et émis à la fois par les feuilles et les fleurs, repoussant ou attirant les insectes. Dufaÿ *et al.* (2004) ont rapporté une localisation atypique de la production des composés volatils impliqués dans la pollinisation chez *Chamaerops humilis*, palmier nain de Méditerranée. Ses feuilles produisent des composés volatils qui attirent des charançons pollinisateurs (*Derelomus chamaeropsis*), alors que les fleurs sont sans odeur. Il arrive que l'émission d'un composé volatil dépende d'événements extérieurs différents et indépendants. C'est le cas du linalol qui est émis par les trichomes de feuilles de tomate. Ce monoterpène serait induit par l'attaque d'araignées rouges (Ament *et al.*, 2004) mais également par l'acide jasmonique (Chris *et al.*, 2007).

### **b) Défense contre les prédateurs**

La nature des composés varie avec le couple espèce végétale/insecte herbivore (Paré et Tumlinson, 1999).

Par ailleurs cette guerre chimique implique non seulement les mécanismes de défense directe par leurs propriétés fongicides, bactéricides et insecticides, mais aussi les mécanismes de défense indirecte en attirant les parasites ou les prédateurs des phytophages.

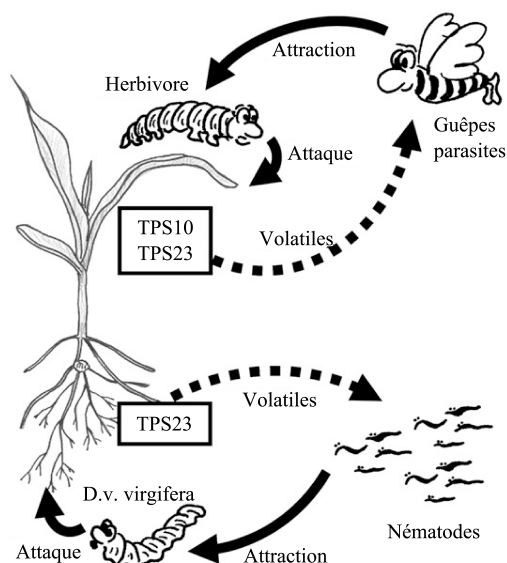
### *(1) Défense directe*

Chez les Gymnospermes, la réaction de défense directe est basée sur la production d'une résine, appelée oléorésine (Phillips et Croteau, 1999 ; Nagy *et al.*, 2000). L'oléorésine est un mélange complexe de terpènes, avec une fraction térébenthine volatile (monoterpènes en C10 et sesquiterpènes en C15) et une fraction résineuse non volatile (diterpènes en C20). Cette résine est synthétisée et stockée dans les tissus conducteurs résinifères retrouvés dans les aiguilles, les branches et le tronc. Suite à une attaque de coccinelles prédatrices, le pin va sécréter une quantité additionnelle de monoterpènes pour se défendre (Trapp et Croteau, 2001). Parfois suite à une attaque xylophage, le sapin de Norvège est capable de mettre en place un réseau de canaux résinifères et d'assurer rapidement l'induction des terpènes synthèses suivie de la synthèse de terpènes. Martin *et al.*, 2002 ont montré que la composition de l'oléoresine sécrétée suite à une attaque était différente de celle synthétisée de façon constitutive. En plus des terpènes retrouvés dans l'oléorésine, on retrouve de la térébenthine qui facilite le transport de l'oléorésine à travers les canaux. Une fois au contact de l'air, les composés volatils de la térébenthine et certains terpènes s'évaporent ne laissant qu'une masse cristalline qui se fige au site de blessure. Cette masse dure et solide va sceller le site de blessure et piéger les insectes prédateurs ainsi que les agents microbiens (Phillips et Croteau, 1999 ; Trapp et Croteau, 2001a). Les angiospermes vont naturellement émettre des composés volatils dont les terpènes, les composés aromatiques, *via* des structures spécialisées comme les trichomes ou autres structures sécrétrices, donnant une odeur caractéristique à la feuille, à la fleur ou au fruit (Paré et Tumlinson, 1997a). Ils sont émis lorsque les structures sécrétrices internes ou externes sont rompues mécaniquement par le prédateur. Par ailleurs, les terpènes peuvent être accompagnés par d'autres composés comme les esters, les alcools ou des aldéhydes appelés « green leaf volatiles » (Paré et Tumlinson, 1999). Enfin, d'autres composés comme le trans- $\beta$ -ocimène, l'indole ou encore l'acétate d'hexényl, sont synthétisés *de novo* dans les heures ou les jours qui suivent la blessure.

### (2) Défense indirecte

Turling *et al.*, 1990 ont décrit pour la première fois ce mécanisme de défense chez le maïs. L'élément central de ce type de défense réside sur l'attraction des ennemis des herbivores qui attaquent les plantes. Cette attraction se fait par l'émission de composés volatils. La défense indirecte a été décrite chez plus de 15 espèces végétales (moncotylédones ou dicotylédones) notamment suite à l'attaque d'arthropodes herbivores (Dicke, 1999; Kessler et Baldwin, 2002). Les bénéfices de la plante suite à cette coopération indirecte se caractérisent par une diminution de l'herbivorie et une augmentation de sa masse fraîche (Bernasconi *et al.*, 1998; De Moraes *et al.*, 1998; Thaler, 1999; Van Loon *et al.*, 2000; Kessler et Baldwin, 2001). Chez le maïs, six terpènes synthèses sont impliquées dans cette défense (Köllner *et al.*, 2004). Trois d'entre elles TPS1, TPS10 et TPS23 sont fortement induites par les attaques d'herbivores et sont à l'origine de la synthèse d'un sesquiterpène majoritaire (Schnee *et al.*, 2002, 2006; Köllner *et al.*, 2008a). L'un des premiers exemples de défense indirecte concerne l'attaque du maïs par *S. littoralis* (larve du vers du coton d'Egypte). Lorsque les composés volatils sont sécrétés suite à l'attaque de *S. littoralis*, la guêpe *Cotesia marginiventris* vient parasiter la larve en y pondant ces œufs. Une fois les œufs éclos, les larves de *Cotesia marginiventris* se développent à l'intérieur de *S. littoralis*, ce qui finit par la tuer. (Turlings *et al.*, 1990) (Figure 11). Les composés volatils émis par le maïs durant l'attaque sont des composés indols issus de la voie des lipoxygénases mais aussi des mono- et sesquiterpènes dont le  $\beta$ -garmotène et le  $\beta$ -farnesène (Turlings *et al.*, 1990 ; Köllner *et al.*, 2004).



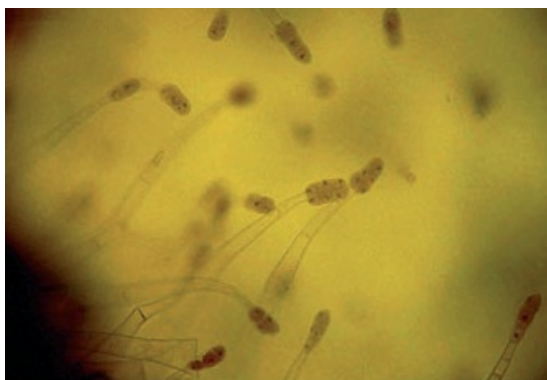


**Figure 11: Médiation des interactions par les terpènes chez le maïs par les airs et par le sol. Les attaques de larves de lépidoptères activent les terpènes synthases TPS10 et TPS23 qui assure la production de terpènes. Ce mélange de molécules volatiles attire des guêpes parasites. Les dommages racinaires par *D.V.virgifera* active la TPS23. Le (E)- $\beta$ -caryophyllène ainsi produit attire les nématodes entomopathogéniques. (Schéma adapté de Degenhardt, 2009).**

### III. Les composés terpéniques des trichomes de *Nicotiana*

#### A. Physiologie et organisation des trichomes de *Nicotiana*

Les trichomes glandulaires sécréteurs (TGS) de *Nicotiana* se caractérisent par 4 à 8 cellules surmontées par une cellule apicale sécrétrice (Figure 12).



**Figure 12 : Trichomes glandulaires de *Nicotiana tabacum* (Gutiérrez-Alcala et al., 2005).**

*Nicotiana* est la plante chez laquelle il a été mis en évidence pour la première fois l'existence d'exsudat terpénique issu des trichomes.

En effet, Keene et Wagner (1985) ont montré que les têtes de trichomes glandulaires sont le seul siège de synthèse de diterpènes (duvatrielediol) notamment chez *N.tabacum*. Des expériences ont montré l'incorporation de  $^{14}\text{C}$  dans les diterpènes de cellules glandulaires isolées (Guo et Wagner, 1994). De même, la biosynthèse de labdénediol et de sclaréol a été observée à partir d'extrait cellulaire de pelure d'épiderme de *N.glutinosa* (Guo et al., 1995). Dans certaines espèces dont le tabac, il est possible de retrouver les deux types de cellules dans un même trichome, des cellules photosynthétiques et des cellules à plastides non photosynthétiques. Les trichomes glandulaires de *Nicotiana tabacum* sont caractérisés par des plastides souvent amyloïdes ainsi que des chloroplastes ne contenant que rarement des grains d'amidon (Turner *et al.*, 1991). Le rôle de ces plastides dans la synthèse des terpènes chez le tabac est essentiel. En effet, il a été montré que l'absence de plastides fonctionnels dans les cellules sécrétrices se caractérise par une faible quantité de terpènes (Neilson *et al.*, 1991). La synthèse est dépendante de la voie MEP chloroplastique. Au niveau microscopique, il a été montré que ces plastides étaient généralement enveloppés par des tubules de réticulum endoplasmique, ce qui indique clairement une exportation des molécules à sécréter vers le cytoplasme (Ascensao *et al.*, 1997). Par ailleurs, une récente analyse immunochimique sur les enzymes de biosynthèse de monoterpènes, a montré que le cytosol, le RE, les plastides et les mitochondries sont indispensables à la synthèse de p-menthane dans la menthe (Turner et Croteau, 2004). Ceci indique que la compartimentation est indispensable à la biosynthèse et à la sécrétion des molécules vers le milieu extérieur.

### **B. Terpènes synthétisés dans les trichomes de *Nicotiana***

Tous les trichomes sécréteurs ne produisent pas seulement des composés volatils. Au contraire, ils vont préférentiellement sécréter des molécules peu ou pas volatils comme les diterpènes ou les sesquiterpènes (Wagner *et al.*, 2004). La quantité de composés sécrétés varie en fonction de l'espèce mais également en fonction des conditions de culture. En effet, dans le tabac cultivé *N.tabacum* les sécrétions de trichomes peuvent représenter jusqu'à 16% du poids sec de la feuille (Wagner, 1991). Les exsudats de *N.tabacum* (lignée TI 1068) sont largement composés de diterpènes non volatils appartenant à deux classes, les cembranes et les labdanes (Heeman *et al.*, 1983). En ce qui concerne les cembranes, il apparaît que la lignée de *N.tabacum* sécrète deux épimères l' $\alpha$  cembrane 2,7,11-triène-4,6-diol et  $\beta$  cembrane 2,7,11-triène-4,6-diol communément nommés les CBT-diol et qui sont non volatils (Figure 13).

Ces composés sont également synthétisés par les trichomes de *N.sylvestris*. Ces composés, à eux seuls, représentent 60% de l'exudat ou de 5 à 10% du poids sec de la feuille (Wagner, 1991). Concernant les labdanes dont le Z-abiénol, il est seulement produit chez *N.tabacum* et absent chez *N.sylvestris*. La voie de synthèse des cembranes est partiellement connue. Chez *Nicotiana*, la biosynthèse de CBT-diol et CBTS-ol se fait exclusivement dans les trichomes. En effet, des trichomes isolés arrivent à reconverter du bicarbonate radioactif en diterpènes. Cela montre par ailleurs leur indépendance vis-à-vis de la feuille notamment grâce à la présence des chloroplastes (Wagner *et al.*, 2001). De plus, la diterpène synthase (cyclase) qui synthétise le squelette des cembranoïdes de la lignée de *N.tabacum* TI 1068 est spécifiquement localisée dans les têtes glandulaires (Guo *et al.*, 1995). Les événements conduisant à la biosynthèse des CBT-diol peuvent se décomposer en deux étapes distinctes. Dans un premier temps la Cembratriène-ol-synthase (cyclase) catalyse la cyclisation du GGPP pour donner les CBT-ols (Wang *et al.*, 2001). Ensuite, le cytochrome P450 (CYP71D16) assure l'hydroxylation en C<sub>6</sub> des CBT-ols pour donner les CBT-diol (Guo *et al.*, 1995) (Figure 13).

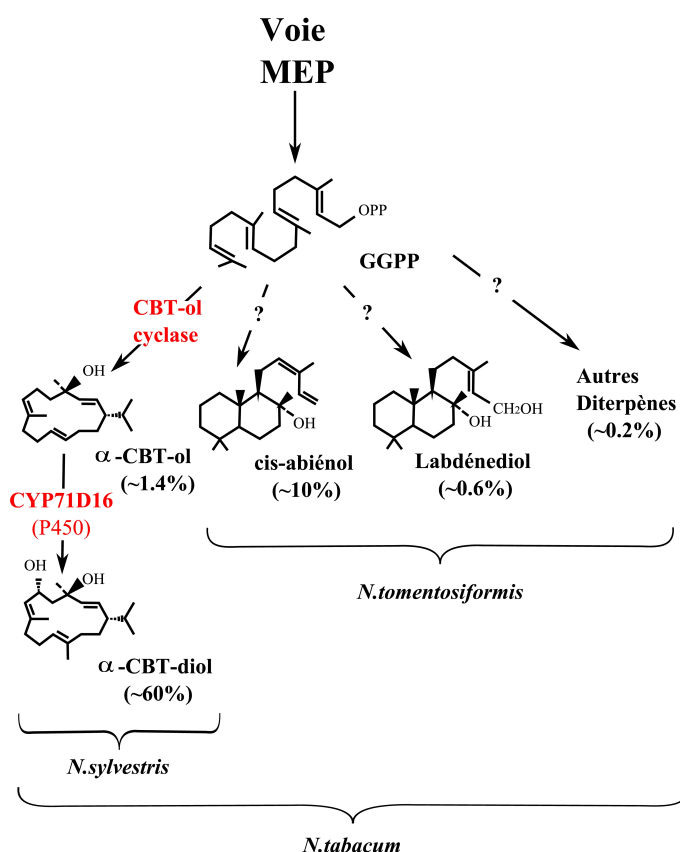
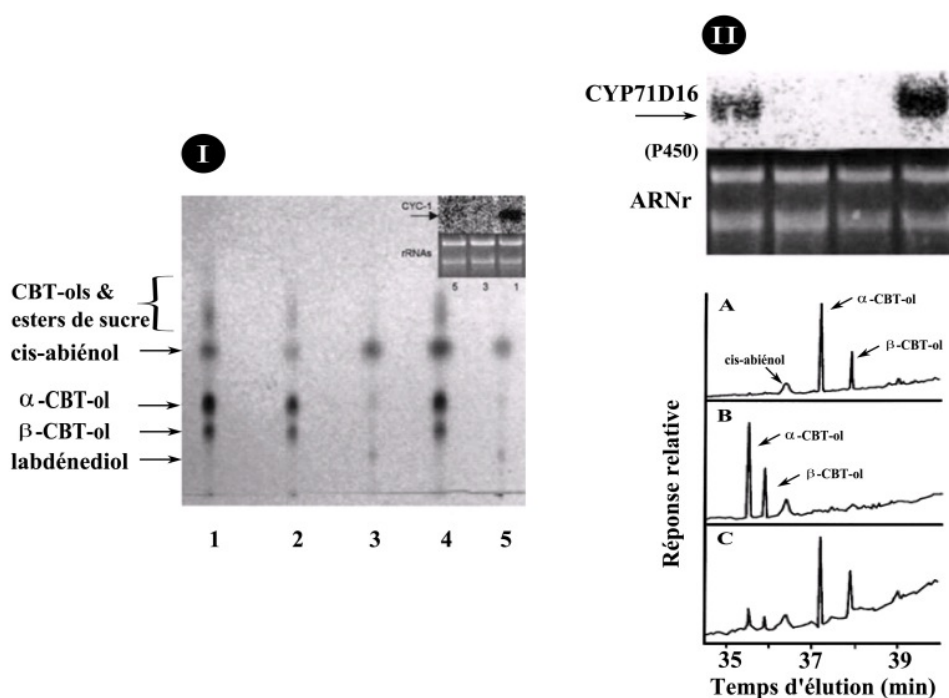


Figure 13 : Voie de biosynthèse des principaux diterpénoïdes composant l'exudat des TGS du tabac. Seuls les isomères α du cembratriène-ol (CBT-ol) et du cembratriène-diol (CBT-diol) sont montrés. GGPP : Géranyl pyrophosphate ; OPP : groupement pyrophosphate (adapté de Wang *et al.*, 2002).

L'équipe de Wagner a construit une banque soustractive de cDNA de trichomes de TI1068 afin d'identifier les gènes des enzymes impliquées dans la biosynthèse des CBT-diol (Wang et Wagner, 2003). L'analyse des séquences a permis d'isoler un clone présentant des homologies avec celui d'une terpène cyclase (CYC-1, NID : AY049090) et un deuxième clone ADNc codant un cytochrome de type P450 (CYP71D16, NID : AF166332) (Wang et Wagner, 2003). Wagner *et al.*, 2001 et 2003 ont développé plusieurs stratégies moléculaires pour diminuer voir supprimé l'expression de ces deux enzymes. Les stratégies moléculaires utilisées sont la co-suppression et la stratégie RNAi sur les deux gènes *CYC-1* et *CYP71D16* de *N.tabacum*. Les analyses de chromatographie gazeuse ont révélé une accumulation de CBT-ols et une diminution de CBT-diols corrélées avec la diminution de l'expression de CYP71D16 (Figure 14II). Par ailleurs, les analyses par chromatographie sur couche mince ont montré une diminution des CBT-ols et des CBT-diols corrélée avec la diminution de l'expression de CYC-1. (Figure 14 I).



**Figure 14 : Suppression de la synthèse de CBT-diol par RNAi du gène de CYP71D16 et du gène de CYC-1.** I : Chromatographie sur CCM d'exsudats de trichomes de *N.t* non transformés et transformés par Cyclase-GUS-hairpin (CGHP) (RNAi) et le northern blot correspondant. 1 : Contrôle ; 2 et 4 : plantes CGHP (Contrôles) ; 3 et 5 : lignées CGHP. Le northern blot montre l'expression du gène CYC-1 dans les trichomes des plantes correspondant aux profils CCM de 1, 3 et 5. II : Chromatogramme en phase gazeuse d'exsudats de *N.tabacum* pour CYP71D16. : Analyse chromatographique de *N.t* non transformés (A) et transformés avec pCYP71D16-GUS hairpin, (RNAi). B : Forte suppression de CBT-diol et C : suppression modérée de CBT-diol. (d'après Wagner *et al.*, 2003).

Librophyt a réussi l'extinction de l'expression de la Cembrantriène-ol synthase dans *N.sylvestris* par RNAi de type intron hairpin (ihp). En effet l'extinction de l'expression du gène de la CBT-ol synthase entraîne une diminution de la synthèse de CBT-diol dans les trichomes de *N.sylvestris* (WO 2006/079727 A1). Cependant, il est important de noter que le précurseur des terpènes à savoir le Géranylgéranyl di phosphate (GGPP) est toujours synthétisé et donc disponible.

### ***IV. Expression spécifique des gènes de terpènes synthases dans le trichome***

La partie promotrice des gènes est responsable en grande partie de leur profil d'expression. Cette expression sera soit constitutive grâce à un promoteur dit constitutif (expression dans tous les tissus) soit spécifique de certains tissus, organes ou cellules voire dépendant d'un processus d'induction (lumière, blessure, traitement chimique). La spécificité peut être assurée de deux manières. Une première possibilité est qu'un facteur de transcription activateur qui s'exprime dans les cellules du tissu va reconnaître et se fixer sur l'élément cis-activateur du promoteur permettant une expression spécifique dans ces cellules. Une seconde possibilité est qu'un facteur répresseur tissu-spécifique peut se fixer à son élément cis-silencer près de la séquence activatrice, rendant l'élément cis-activateur inaccessible à son facteur de transcription (Lewin et Sanlaville, 1999).

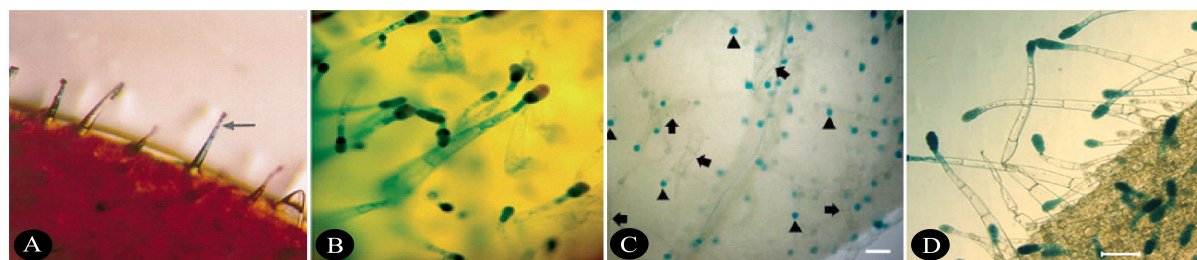
#### ***A. Eléments cis-régulateurs des promoteurs spécifiques des trichomes***

Cette notion désigne un promoteur qui est principalement actif dans des trichomes uni ou pluricellulaires bien qu'une expression résiduelle dans les autres types cellulaires (épiderme, racines) est également possible. Wang *et al.*, 2002 ont découvert que la séquence régulatrice (1852 pb) du gène de *CYP71D76* permet de diriger l'expression du gène rapporteur *GUS* spécifiquement dans les cellules sécrétrices des trichomes de *N.tabacum*. Dans la littérature, d'autres cas concernent l'analyse de promoteurs des gènes de protéines impliquées dans le transfert des lipides (LTP) chez le coton. Ainsi la séquence régulatrice (1548pb) de *LTP3* fusionnée à un gène *GUS* a été transformée dans le tabac. L'analyse montre, qu'au stade de plantule, il y a une expression dans les trichomes de feuilles et une absence d'expression dans les cellules épidermiques.

Il semblerait qu'une séquence de 315 pb (non identifiée précisément), entre les positions -614 et -300 en amont de l'ATG soit responsable de la spécificité cellulaire du promoteur (Hsu *et al.*, 1999 . Liu *et al.*, 2000).

Le promoteur du gène de *LTP6* permettrait également une expression spécifique dans les trichomes de tabac. Cependant l'expression se localise non pas dans les cellules sécrétrices mais dans les cellules basales (Hsu *et al.*, 1999) (Figure 15A). En 2007, Delaney *et al.*, montrent que la fusion transcriptionnelle FSltp4 entraîne une expression du rapporteur GUS dans tous les types de trichomes. Par ailleurs, la fusion du promoteur (2062 bp) du gène de *GaMYB2* (homologue d'*AtGL1*) avec le gène rapporteur GUS montre une expression dans les cellules en développement des fibres de *Gossypium hirsutum* et dans les trichomes des bractées, feuilles et tiges (Shangguan *et al.*, 2008). En revanche l'expression du gène *GUS* pour la même construction est spécifique du trichome chez *N.tabacum*, et *A.thaliana*. La coloration bleue est observée seulement dans les trichomes glandulaires sécréteurs de *N.tabacum* (Shangguan *et al.*, 2008). Ces études montrent la complexité de la régulation transcriptionnelle de ces promoteurs avec notamment des différences d'une espèce à une autre, d'un stade de développement à un autre et même d'un type de trichome à un autre. Cependant, l'espèce *Nicotiana* reste le point commun de toutes ces études puisqu'il semble être un modèle favorable à ces analyses transcriptionnelles. Des études de délétions effectuées notamment pour le promoteur de *CYP71D16* ont permis de montrer une diminution progressive de l'intensité d'expression du gène rapporteur *GUS* dans les trichomes mais jamais une absence totale de coloration (Wang *et al.*, 2002). Les prédictions bioinformatiques ont révélé la présence d'éléments cis de type MYB dont six sont retrouvés sur le promoteur *CYP71D16* (Wang *et al.*, 2002). Dans ce cas il est suggéré que la séquence MYB-like CAACAG serait responsable de la spécificité trichome. La spécificité trichome peut s'appliquer pour une molécule lorsqu'elle est sécrétée par un type de trichomes sur une feuille de *Nicotiana*. Ainsi, la fusion du promoteur des phylloplanines au gène rapporteur *GUS* ou *GFP* montre une expression seulement dans les petits trichomes glandulaires (SGTs) (Sheperd *et al.*, 2005). Concernant les promoteurs non impliqués dans la biosynthèse des terpènes comme celui *GaMyb2*, il a été identifié également des éléments cis de type MYB et de type HbH avec notamment la fixation du facteur GL3 par crible simple hybride sur une séquence T/Gbox du promoteur *GaMyb2* (Shangguan *et al.*, 2008). Enfin, une analyse du promoteur de *GaRDL1* montre la présence d'une L1-box et d'une séquence core-MYB qui confèrent une expression spécifique dans les trichomes à ce promoteur (Figure 15D).

La mutation de l'un ou l'autre de ces éléments entraîne en effet une réduction de l'activité du promoteur de *GaDRL1* dans les trichomes tecteurs d'*Arabidopsis thaliana*.



**Figure 15 : Expression de différents promoteurs hétérologues dans les trichomes de *Nicotiana tabaccum*:**  
**A :** TGSs exprimant pLTP6-GUS (coton) (Chuan *et al.*, 1999) ; **B :** pATP-GUS (menthe) (Gutiérrez *et al.*, 2005) ; **C :** pI2b-GUS (*Solanum Americanum*) (Liu *et al.*, 2006) ; **D :** pGaMyB2-GUS (coton) (Shangguan *et al.*, 2008).

### ***B. Facteurs trans-régulateurs des promoteurs spécifiques des trichomes***

Le fonctionnement d'un promoteur va aussi dépendre des facteurs trans qui reconnaissent les éléments cis. Par exemple le facteur de transcription GL3 reconnaît un site sur le promoteur du gène *GaMYb2* du coton (Shangguan *et al.*, 2008). Sur ce même promoteur, une autre séquence est reconnue par un autre facteur de transcription TT8 impliqué dans la biosynthèse d'antocyanine des flavonoïdes (Payne *et al.*, 2000 ; Zang *et al.*, 2003 ; Ramsay et Glover, 2005). Aussi un même promoteur peut être régulé par un facteur lié au développement et un facteur lié au métabolisme. Les mêmes questions se posent pour la régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme terpénique des TGS de *Nicotiana*, que ce soit le cytochrome P450 (CYP71D16) ou la Cembratriène-diol-synthase. Peu de réponses sont disponibles dans la littérature scientifique, seules des hypothèses ont été proposées à partir des analyses bioinformatique (Wang *et al.*, 2002). La mise en évidence de ces facteurs régulateurs est importante au niveau fondamental. Par ailleurs, ils pourraient constituer un outil moléculaire favorable à l'amélioration des procédés bio-industriels de production des molécules d'intérêt. En 2007, Delaney *et al.* montrent que la fusion transcriptionnelle FSLtp4 (coton) avec le gène rapporteur *GUS* entraîne une coloration bleue dans tous les types de trichomes de *N.tabaccum*. Par une analyse des délétions, les auteurs ont identifié une séquence de 84pb nécessaire à la spécificité cellulaire. En utilisant cette séquence comme cible, ils ont isolé la protéine GhAT1 lors d'un crible simple hybride.

GhAT1 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs promoteurs dans les plantes (Tjaden et Coruzzi 1994, Reisdorf-Cren *et al.*, 2002, Matsushita *et al.*, 2007). La surexpression de 35S::GhAT1 dans les lignées *FSltp4::GUS* montre une absence de coloration dans la plupart des trichomes. Par ailleurs, ceci s'accompagne d'une baisse du niveau de la protéine FSltp4 dans les plantes de tabac transgéniques (Figure 15C).

### ***V. Amélioration de la production de composés organiques***

L'homme a cherché, depuis des millénaires, à exploiter les plantes de façon optimale pour en extraire un maximum de ressources. Il a acquis, depuis peu, une aptitude supplémentaire, celle de modifier à son avantage le fonctionnement de l'Usine Végétale. Cette capacité s'ajoutant à une exploitation raisonnée de la biodiversité doit apporter de nouveaux bénéfices et produits issus du monde des plantes. Les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires recherchent de nouvelles substances naturelles à forte valeur ajoutée et au besoin utilisent les méthodes de l'ingénierie métabolique appliquées aux plantes. Ces molécules d'intérêt peuvent constituer la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales.

#### ***A. Cultures cellulaires et tissulaires de plantes***

Pour augmenter la production de métabolites secondaire d'intérêt, différentes stratégies sont envisagées en culture cellulaire ou tissulaire végétale. Il est possible notamment de réduire le flux métabolique entre des voies compétitives, de réduire le catabolisme ou de surexprimer des gènes régulateurs.

Exemple du paclitaxel (précurseur du taxol) (Frense *et al.*, 2007 : pour revue)

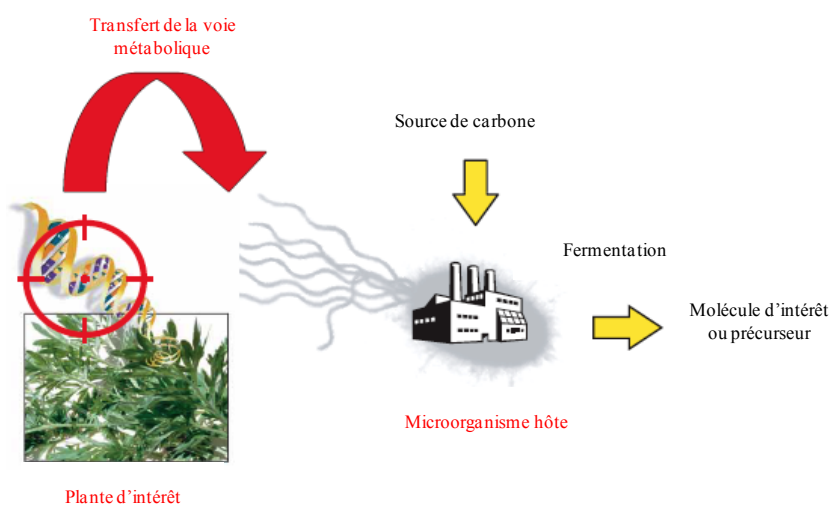
Des essais de cultures de cellule de l'if ont été faits pour surproduire le paclitaxel mais une régulation négative entraîne la dégradation de la molécule (Wu *et al.*, 1999). La création d'un bioréacteur à perfusion a permis d'extraire la molécule au fur et à mesure de la production (De Dobbeleer *et al.*, 2006) sur des cultures cellulaires de *Nicotiana tabaccum* a donné de meilleurs rendements. Cependant, pour la majorité des molécules d'intérêt, il subsiste toujours des contraintes comme la lenteur de production et le faible rendement de la culture cellulaire. Dans l'optique industrielle, ces expérimentations restent utiles pour étudier les voies de biosynthèses de ces molécules. Par exemple, une voie métabolique pourrait être manipulée en la traitant par divers effecteurs de la voie de transduction du signal (Verpoorte *et al.*, 2000).



Verberne *et al.* (1998) ont introduit deux gènes microbiens dans le tabac, un codant l'isochorismate synthase (*E.coli*) et un autre codant l'isochorismate pyruvate lyase (*P.fluorescence*). Sous le contrôle d'un promoteur 35S et couplés à une séquence d'adressage chloroplastique, les deux enzymes ont été exprimées dans la culture de cellules de tabac. Ces cellules se sont mises à produire de l'acide salicylique de façon constitutive (Verberne *et al.*, 1998).

### B. Culture de microorganismes et production de terpénoïdes

Une alternative à la culture cellulaire est l'utilisation des bactéries ou des levures pour assurer la production des molécules pharmaceutiques (Figure 16). Dans cette approche, l'ensemble des gènes impliqués dans une voie de biosynthèse (plante) sont transférés dans *E.coli* ou *S.cerevisiae*. L'étape initiale est de construire une souche *E.coli* ou *S.cerevisiae* capable de générer le précurseur IPP. Il est important de considérer que cela apporte une voie IPP en plus de la voie endogène. Aussi une solution serait de rediriger le flux interne au profit de la voie hétérologue. Cette stratégie implique toujours des contraintes comme la toxicité due à une forte concentration en molécules ou encore une mauvaise conformation des enzymes (absence de modification post transcriptionnelle, absence de compartimentation). Par ailleurs, l'hôte bactérien n'offre pas un environnement métabolique favorable aux nombreuses modifications du squelette terpénique comme les hydroxylations par les cytochromes P450 (Khlosla *et al.*, 2003). Cependant des essais prometteurs ont permis la production de sesquiterpènes dans *E.coli* et de caroténoïdes dans *S.cerevisiae* (Shimada *et al.*, 1998).



**Figure 16 : Transplantation d'une voie de biosynthèse d'une plante vers un microorganisme.**

Les gènes des enzymes de la voie sont importés dans l'hôte unicellulaire. Une culture à forte concentration de carbone permet de produire la molécule d'intérêt par fermentation (Chang et Keasling, 2006).

### C. Les méthodes de transgénèse visant les TGS

#### 1. Amélioration de la qualité de l'huile essentielle de la menthe

L'huile essentielle de la menthe contient en plus du menthol un composé indésirable, le menthofurane, qui contribue à en déprécier la flaveur. Chez des plantes soumises à un stress, le menthofurane peut atteindre des quantités importantes rendant l'huile inexploitable. Mahmoud et Croteau (2001) ont d'une part surexprimé le gène DXR (enzyme de la voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP chloroplastique) et d'autre part supprimé l'expression du gène de la menthofurane synthase (MFS ou Cytochrome P450 responsable de la conversion du pulegone en menthofurane en aval de l'IPP : voie cytoplasmique) chez la menthe poivrée. Dans les plantes obtenues, trois phénotypes ont été observés. L'un, majoritaire qui se caractérise par une augmentation de 50% d'huile produite mais la composition reste la même que celle de la plante sauvage. Le deuxième phénotype rassemble des plantes ayant une altération de la pigmentation, due à la cosuppression du gène DXR interne. Enfin, le troisième répond aux attentes avec une diminution du menthofurane et une augmentation du menthol. Dans une autre expérience, Mahmoud et al. (2004) ont transformé des plantes de *Mentha x piperita* indépendamment avec les ADNc de la limonène synthase et de la limonène 3-hydroxylase de menthe. Bien que les deux ADNc soient surexprimés de façon constitutive dans les plantes transgéniques obtenues, aucun changement n'est observé dans le rendement ou la qualité de l'huile. Les auteurs concluent que la limonène synthase n'est pas surexprimée de façon suffisante dans les cellules des trichomes sécréteurs.

La surexpression de la limonène 3-hydroxylase, entraîne une cosuppression du gène endogène dans de nombreuses plantes. En conséquence, dans ces plantes cosupprimées, le limonène s'accumule dans l'huile essentielle des trichomes sécréteurs. Ces expériences d'ingénierie chez la menthe montrent qu'il est possible de modifier la quantité et la qualité des composés volatiles produits par les cellules sécrétrices. Les résultats obtenus sont utiles et montrent que les trichomes sécréteurs sont une alternative intéressante aux cultures cellulaires et bactériennes pour la production des molécules d'intérêt.

#### 2. Transgénèse hétérologue dans *Nicotiana*

L'introduction d'un gène unique impliqué dans les voies de biosynthèse des composés volatils a été rapportée plusieurs fois (Lewinsohn *et al.*, 2001 ; Lückner *et al.*, 2001 ; Lavy *et al.*, 2002). Chez le tabac, trois enzymes utilisant le même substrat ont été introduites dans la même plante : la limonène synthase, la terpinène synthase et la pinène synthase.

Ces trois monoterpènes synthases du citron, adressées aux plastes, ont été utilisées seules ou en combinaison. L'introduction de ces trois enzymes dans des plantes transgéniques de tabac entraîne une production de monoterpènes en quantités 10 à 20 fois plus importantes que chez les plantes non transformées, avec de nombreux monoterpènes absents des tabacs non transformés (limonène,  $\gamma$ -terpinène,  $\beta$ -pinène...) (Lücker *et al.*, 2004a). Le profil des composés émis par les fleurs et par les feuilles de tabac a donc été modifié et ce changement est détectable par l'odorat humain (Lücker *et al.*, 2004a). Parallèlement, la limonène 3-hydroxylase de *Mentha spicata*, adressée au réticulum endoplasmique (RE), a été introduite dans la lignée de tabac TERLIMPIN exprimant les trois monoterpènes synthases de citron (Lücker *et al.*, 2004a). L'analyse des composés volatils émis par les fleurs des plantes obtenues révèle que, malgré une localisation différente des enzymes impliquées (plastides et RE), les fleurs produisent du (+)-trans-isopipériténol à partir du limonène, contrairement aux fleurs de la lignée TERLIMPIN témoin (Lücker *et al.*, 2004b). Ceci implique que certains monoterpènes sont transportés, activement ou passivement, des plastides au RE.

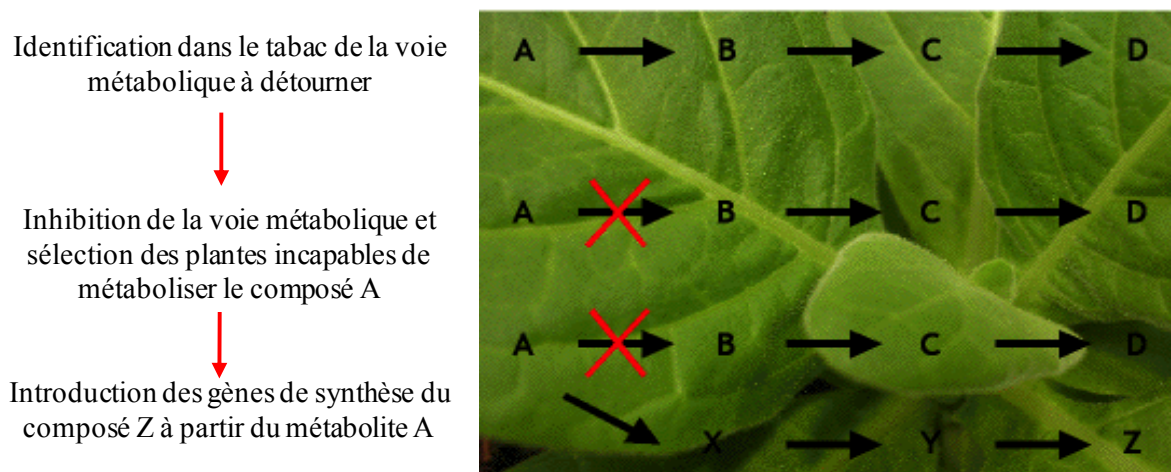
Ces expériences montrent qu'il est possible de faire produire à certaines espèces végétales des composés volatils hétérologues, à condition que le substrat soit disponible (Lücker *et al.*, 2004b). Le tabac semble être adapté aux expériences de bioingénierie pour augmenter les quantités de composés volatiles que ce soit *via* les fleurs ou *via* les trichomes. Ainsi il est facilement imaginable de produire et d'augmenter des composés volatiles d'intérêt que ce soit des fragrances ou des molécules pharmaceutiques. Les connaissances sur les gènes de terpènes synthases et sur les métabolismes terpéniques sont des atouts majeurs dans les avancées biotechnologiques futures.

## ***VI. Projet de recherche***

### ***A. Le procédé Librophyt***

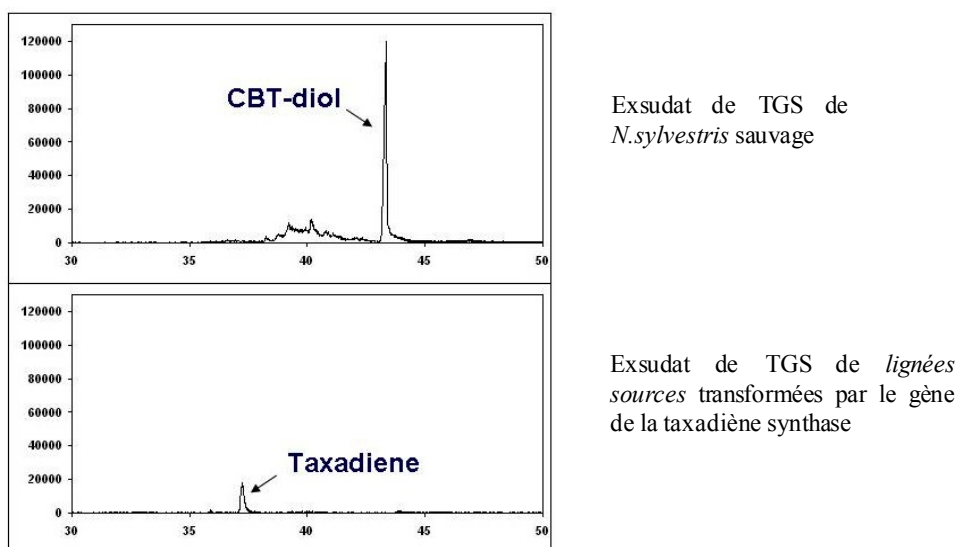
L'utilisation d'organes spécialisés dans la production de terpènes permet de contourner les problèmes de toxicité rencontrés dans les cultures de microorganismes et d'atteindre des bons niveaux de production qui conduiront à des coûts inférieurs aux coûts des procédés actuels. Parmi les espèces possédant des trichomes, étaient des cibles potentielles de développement. Librophyt a choisi *Nicotiana sylvestris* pour plusieurs raisons. Cette variété possède un profil d'expression simple avec la sécrétion d'un diterpène majoritaire, le CBT-diol qui peut représenter jusqu'à 5% de la matière sèche de la plante.

*N. sylvestris* est une variété qui possède un cycle reproducteur court et une grande masse foliaire favorable à une production à grande échelle. Enfin, l'un des avantages est l'absence de croisement avec le tabac cultivé en agriculture évitant toute contamination de la filière du tabac à cigarette. Enfin, sa transformation génétique est bien maîtrisée. La stratégie mise en œuvre par Librophyt consiste dans un premier temps à bloquer la voie de biosynthèse des diterpènes du tabac à une étape clé permettant de rendre disponible les précurseurs pour la synthèse d'autres terpènes. Dans un deuxième temps, une nouvelle voie de biosynthèse est élaborée en plaçant des gènes de biosynthèse exogènes sous le contrôle de promoteurs spécifiques des cellules sécrétrices des TGSs. Les enzymes exogènes correspondantes peuvent alors synthétiser des molécules d'intérêt à partir des précurseurs disponibles (Figure 17).



**Figure 17 : Principe du procédé Librophyt**

Librophyt a développé une stratégie scientifique basée sur l'universalité et la disponibilité des précurseurs (IPP et DMAPP) dans des cellules productrices (les trichomes). Cette universalité pourra être utilisée pour la synthèse de terpènes d'une même classe. Par ailleurs, Librophyt a développé des lignées de tabac n'exprimant plus la Cembratriène diol-synthase (Tissier *et al.*, brevet n°FR2006 :000188) par la technique de RNAi. Ainsi dans les trichomes de ces lignées sources (LS) de *N. sylvestris*, le métabolisme terpénique est bloqué à la première étape de biosynthèse du CBT-diols. Cela permet de rendre plus disponible le géranylgéranyl diphosphate, précurseur des diterpènes. (Figure 18).



**Figure 18 : Chromatogramme en phase gazeuse d'exsudats de *N. sylvestris* sauvage (a) et de *N. sylvestris* (lignées sources) exprimant la taxadiène synthase. La quantité produit de taxadiène est de 2mg/g de matière sèche. (D'après Alain Tissier).**

Ainsi, l'introduction dans le tabac du gène de la taxadiène-4(5), 11(12) diène synthase sous le contrôle du promoteur de la CBT-diol synthase a permis la synthèse du taxadiène dans les trichomes de *N. sylvestris*. Cette nouvelle lignée a été nommée NsTax.

### **B. Objectifs du projet de thèse**

La production de molécule de synthèse ou encore l'exploitation extensive des ressources naturelles ne suffisent pas à satisfaire la demande de plus en plus grande. Ce constat a stimulé les recherches pour développer des approches biotechnologiques. Ceci dans le but de compléter les technologies de production de ces substances à forte valeur ajoutée. La stratégie de Librophyt est d'utiliser des promoteurs spécifiques des TGSs de *N.sylvestris*. L'un des promoteurs trichomes-spécifique caractérisé par Librophyt est celui de la Cembratriène-diol-synthase (*NsTPSO2a*). Ce gène appartient à une famille multigénique composé de 3 gènes fonctionnels et d'un pseudogène (Ennajdaoui et al., 2009 soumis). Le promoteur de 3,4kb confère une expression spécifique dans les trichomes glandulaires de *N. sylvestris*. La spécificité a également été mise en évidence sur un fragment plus court de 1,7kb par une fusion transcriptionnelle de cette version courte avec le gène rapporteur GUS dans les lignées sources de *N. sylvestris*. Par ailleurs, Librophyt a mis à notre disposition la séquence de quatre autres promoteurs trichomes spécifiques notamment de *Solanum Lycopersicum* et *N.tabacum* que nous avons notamment utilisés pour l'analyse *in silico*.

Dans une première partie, nous avons étudié la séquence promotrice P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> en la comparant avec les promoteurs identifiés par Librophyt ainsi que d'autres promoteurs connus pour être spécifiques du TGS d'autres solanacées. Pour compléter cette étude bioinformatique, nous avons recherché des éléments cis responsables de la spécificité d'expression dans les trichomes dans le P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> par des expériences de délétions et de fusions transcriptionnelles. Comme tous les promoteurs régulés de façon spécifique, la régulation de P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> dépend aussi des différents facteurs trans capables de reconnaître leurs séquences cibles (Singh *et al.*, 1998) et ainsi conférer la spécificité d'expression de la protéine dans les TGS de *N.sylvestris*. Aussi, dans une deuxième partie, nous avons recherché les facteurs trans régulateurs capables de reconnaître la ou les séquences cis identifiées comme responsables de la spécificité. Avec l'ensemble des données disponibles, les éléments cis et facteurs trans identifiés dans ce travail pourront être directement utilisés dans le procédé de Librophyt pour améliorer la quantité de molécules d'intérêt dans le trichome glandulaire de *N.sylvestris*.

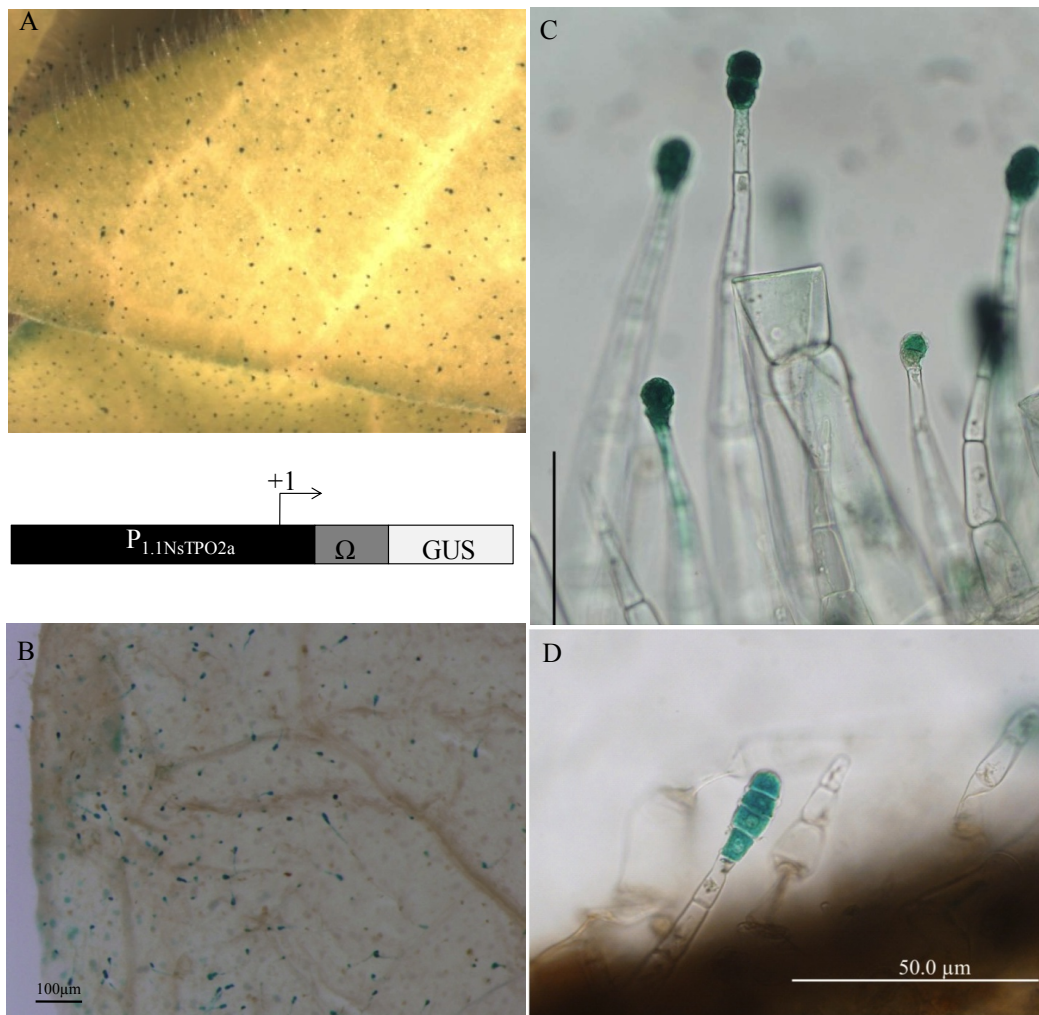
# RESULTATS

## ***Chapitre I : Analyse fonctionnelle de $P_{1.1NsTPSO2a}$***

Le promoteur  $P_{NsTPSO2a}$  est responsable de la spécificité d'expression du gène *NsTPSO2a* dans les têtes de TGSs. La région promotrice de *NsTPSO2a* déterminée par Librophyt a une longueur de 1.7kb. L'analyse préliminaire de l'expression du gène *GUS* sous le contrôle de 1,7kb ( $P_{1.7NsTPSO2a}$ ) montre une expression spécifique dans les têtes glandulaires des TGSs. Le fragment de 1,1 kb de cette région promotrice doit être suffisant pour conférer cette spécificité via des éléments cis ou trans régulateurs. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons développé deux axes de recherche. Le premier concerne la mise en évidence des éléments cis responsables de la spécificité d'expression dans les TGSs et le deuxième concerne la recherche du ou des facteurs trans reconnaissant ces éléments cis.

### ***I. Expression spécifique dans les têtes des trichomes glandulaires (TGSs)***

Pour vérifier la spécificité d'expression du trichome et identifier les régions impliquées dans la régulation du promoteur, nous avons choisi d'utiliser la stratégie de l'analyse fonctionnelle *in vivo* après délétion partielles du promoteur et fusion avec le gène rapporteur *GUS*. Cette spécificité dans le trichome a été mise en évidence par une fusion transcriptionnelle de  $P_{1.1NsTPSO2a}$  avec le gène rapporteur *GUS* dans des plantes sources (#904) (n'exprimant pas *NsTPSO2a*) de *N. sylvestris*.



**Figure 19 : Expression spécifique  $P_{L1NsTPSO2a}::GUS$  dans les têtes de trichomes glandulaires de *N.sylvestris*. La séquence promotrice  $P_{L1NsTPSO2a}$  et la séquence régulatrice de traduction Oméga ( $\Omega$ ) ont été placées en amont du gène rapporteur  $GUS$  (B). De jeunes feuilles de plantes (T2) ayant reçues le transgène ont été incubées dans le tampon de réaction. La figure 18A représente l'expression spécifique de  $P_{L7NsTPSO2a}::GUS$  dans les têtes de TGSs (A) (photo Alain Tissier). Les trichomes bleus exprimant la construction  $P_{L1NsTPSO2a}::GUS$  ont été visualisés à la loupe binoculaire (C). Un grossissement au microscope permet de voir le détail de la coloration au niveau de la tête des trichomes glandulaires (D) et au niveau des cellules (E).**

L'activité de la Glucuronidase, relative à l'activité de  $P_{L1NsTPSO2a}$  a été observée chez 5 lignées T2 transgéniques indépendantes. Les observations montrent que l'expression du gène rapporteur est spécifiquement localisée au niveau des trichomes glandulaires lorsque qu'il est sous contrôle du  $P_{L7NsTPSO2a}$  (Figure 19A) et  $P_{L1NsTPSO2a}$  (Figure 19C). Le détail à fort grossissement permet de visualiser une coloration au niveau de la tête glandulaire (Figure 19D) des trichomes glandulaires. Nous visualisons clairement une coloration bleue dans les cellules sécrétrices de la tête et une absence de coloration dans les cellules du pied (Figure 19D et 19E). Nous n'observons aucune coloration dans les trichomes tecteurs (Figure 19E).



Ce profil d'expression rappelle celui d'un autre promoteur contrôlant un gène impliqué dans la voie de biosynthèse des terpènes dans les trichomes de *N.tabacum*, P<sub>CYP71D16</sub> (P450). En effet l'enzyme codée par ce gène est impliquée dans la voie de biosynthèse du CBT-diol en aval de la Cembratriène-diol synthase dans les cellules glandulaires des trichomes sécréteurs de *N.sylvestris*.

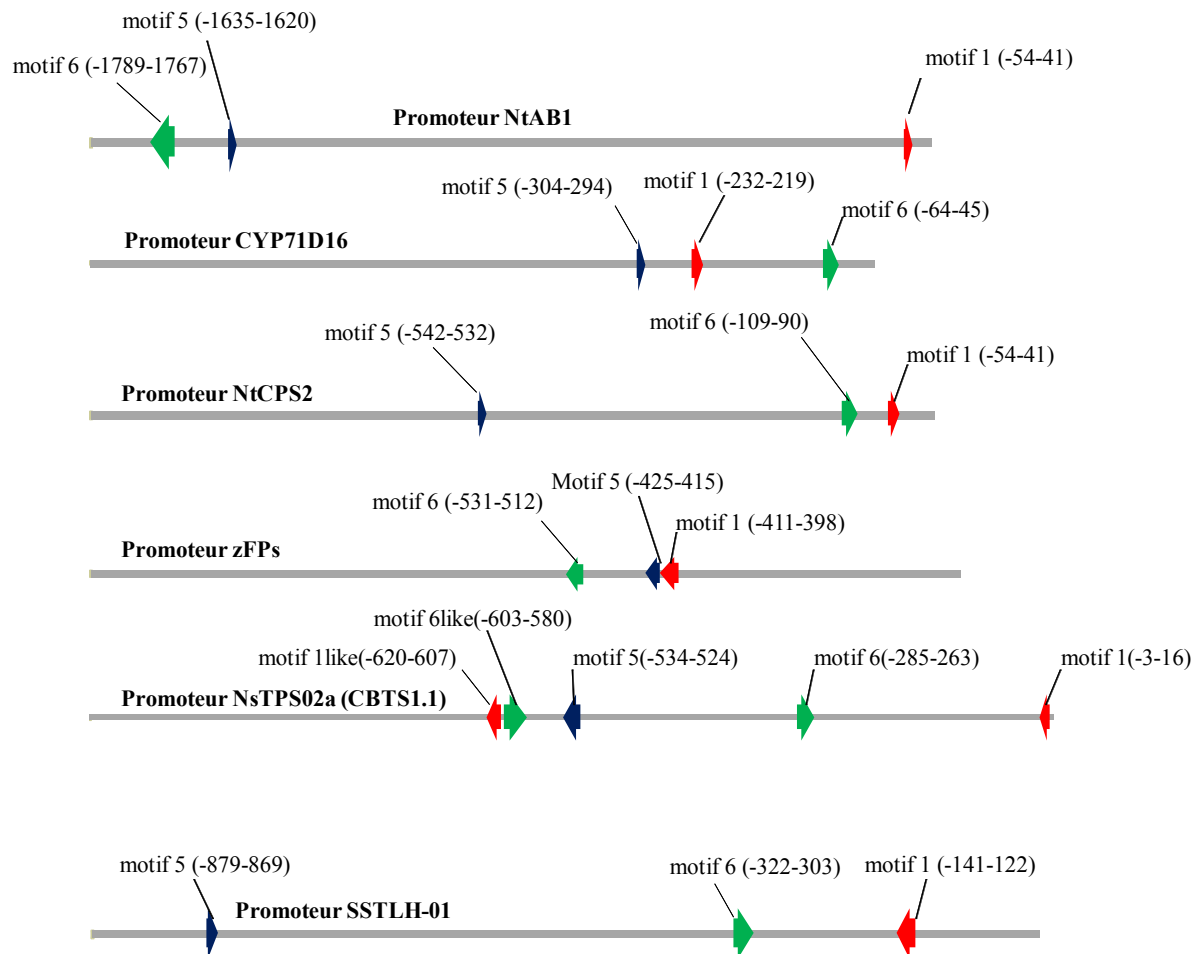
En conclusion, *NsTPSO2a* semble s'exprimer spécifiquement au niveau du trichome glandulaire long et plus particulièrement au niveau des cellules sécrétrices constituant la tête du trichome. Ce profil d'expression suggère l'existence d'un ou de plusieurs éléments cis responsables de cette spécificité stricte et qui sont localisés dans la région 1,1 du P<sub>NsTPSO2a</sub>.

## ***II. Analyse bioinformatique des promoteurs de terpènes synthases de TGSs***

Librophyt a caractérisé quatre autres promoteurs trichomes spécifiques notamment chez *Solanum lycopersicum* et *N.tabacum*. Une analyse bioinformatique préalable a permis de comparer ces promoteurs trichomes spécifiques et ainsi de mettre en évidence des éléments présentant des similitudes. Grâce à cette analyse nous avons pu générer dix délétions séquentielles et contigües dans le promoteur P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>.

### ***A. Identification de motifs consensus sur cinq promoteurs trichomes-spécifiques***

Les travaux de Wang *et al*, 2002 ont démontré que le promoteur P<sub>CYP71D16</sub> (Phytochrome P450) était spécifique des trichomes de *N. tabacum*. Depuis, Librophyt a isolé d'autres promoteurs trichomes spécifiques impliqués de la biosynthèse de terpènes. Ainsi la fusion transcriptionnelle du promoteur de la Farnezyl phosphate synthase avec le gène rapporteur *GUS* s'exprime spécifiquement dans les trichomes de *N.sylvestris* (Sallaud *et al.*, 2009). Enfin, les promoteurs des gènes *SSTLH* (Sesquiterpène synthase de *Lycopersicon hirsutum*), *NtCPS2* (*N.tabacum* copalol diphosphate synthase), *Nt-ABI* (*N.tabacum* Abiénol synthase) tendent également vers une expression spécifique dans les trichomes glandulaires (Librophyt, résultats non publiés) (Figure 20). La comparaison de ces séquences promotrices qui entraînent des profils d'expression similaires peut permettre d'identifier des motifs consensus pouvant ensuite être analysés expérimentalement.



**Figure 20 : Analyse des motifs prédictifs dans les promoteurs trichomes-spécifiques chez la tomate et le tabac. Alignement des promoteurs trichomes spécifiques de *NtAB1* (1955pb), de *CYP71D16* (1001pb), de *NtCPS2* (1001pb), de *zFPs* (1214pb), de *NsTPSO2a* ( $P_{1.1NsTPSO2a}$  1060pb), *SSSLH* (1000pb). Les motifs 1,5 et 6 communs à tous les promoteurs, sont respectivement représentés par une flèche rouge, bleue et verte sur les séquences. La position de chaque motif est déterminée à partir de l'extrémité 3' de chaque séquence promotrice.**

L'analyse bioinformatique des séquences régulatrices a pour but d'identifier des motifs communs avec une longueur comprise entre 6 et 20pb. Nous avons comparé les séquences des promoteurs en utilisant le logiciel MEME (Multiple Em for Motifs Elicitation [http://meme.sdsc.edu/meme4\\_1/cgi-bin/meme.cgi](http://meme.sdsc.edu/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi)) et identifié des motifs consensus qui pourraient avoir le rôle d'élément cis-régulateur. L'alignement des promoteurs trichomes spécifiques de *NtAB1* (1955pb), de *CYP71D16* (1001pb), de *NtCPS2* (1001pb), de *zFPs* (1214pb), de *NsTPSO2a* ( $P_{1.1NsTPSO2a}$ : 1060pb), de *SSSLH* (1000pb) a montré que trois motifs (1,5 et 6) sont communs à tous ces promoteurs sur les 6 motifs mis en évidence.

Ces motifs présents sur  $P_{1.1N\delta TPSO2a}$  ont ensuite été analysés sur la base de données PLACE (PLACE <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) pour déterminer si ces motifs étaient déjà répertoriés dans la littérature.

**B. Analyse des motifs identifiés dans la séquence de  $P_{1.1N\delta TPSO2a}$**

Les 3 motifs retrouvés dans les promoteurs spécifiques du trichome sont illustrés dans la figure 21.

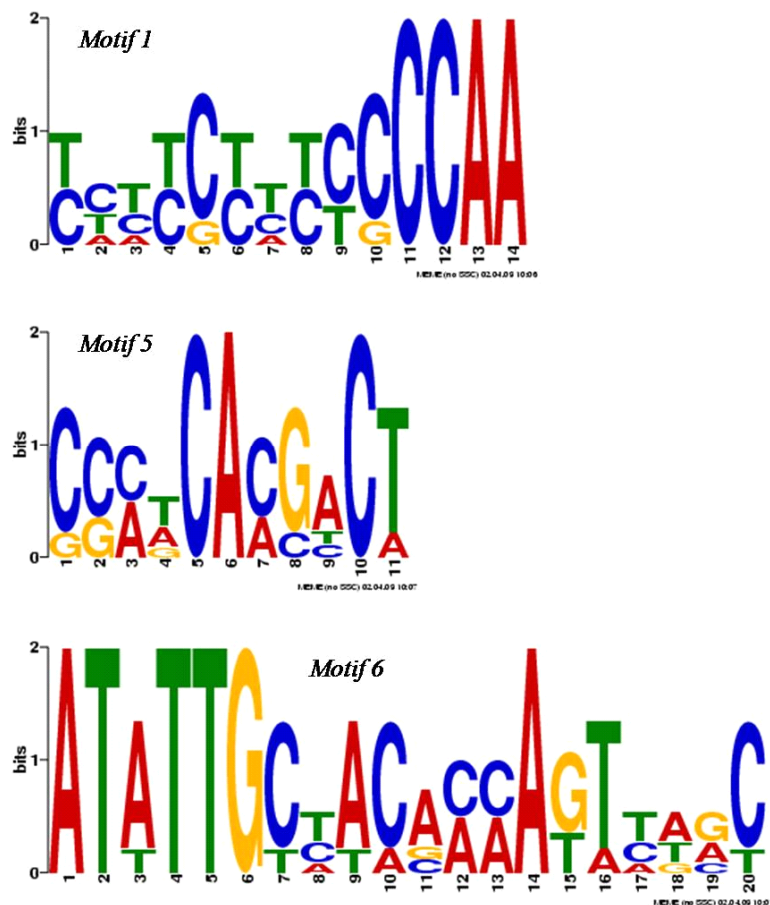


Figure 21 : Détails des motifs prédictifs trouvés dans la séquence de  $P_{1.1N\delta TPSO2a}$ .

Les logos consensus ont été réalisés pour les motifs 1,5 et 6 retrouvés sur tous les promoteurs trichomes spécifiques. La taille des lettres est proportionnelle à la fréquence relative de chaque base à cette position (cf Multiple Em for Motifs Elicitation [http://meme.sdsc.edu/meme4\\_1/cgi-bin/meme.cgi](http://meme.sdsc.edu/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi)).

Le motif n°1 d'une longueur de 14pb a été étudié à l'aide du logiciel et de la banque de données sur les facteurs de transcription des plantes. La séquence AAAG a été trouvée dans ce motif (Figure 21). La présence de cette séquence dans les six promoteurs trichomes-spécifiques comparés suggère la fixation des facteurs de transcriptions de type DOF (DNA-binding with one finger) possédant un doigt de zinc (Yanagisawa *et al.*, 1999).

Les protéines DOF1 et DOF2 seraient des facteurs associés à la transcription de plusieurs gènes du métabolisme carboné du maïs (Yanagisawa *et al.*, 2000). PLACE a mis en évidence deux éléments *cis* régulateurs sur le motif n°5 (Figure 21). La première séquence régulatrice GTGA est présente dans le gène *g10* impliqué dans la maturation du pollen chez *N.tabacum* (Rogers *et al.*, 2001). Le deuxième élément *cis*-régulateur (G/T)CACG(T/A) fixerait la partie C-terminale des facteurs RHEs (Root hair-specific *cis*-Elements). D'après Kim *et al.* (2006), ces facteurs spécifiques des poils absorbants ont une fonction régulatrice conservée dans la différenciation des cellules racinaires et non racinaires chez les Angiospermes.

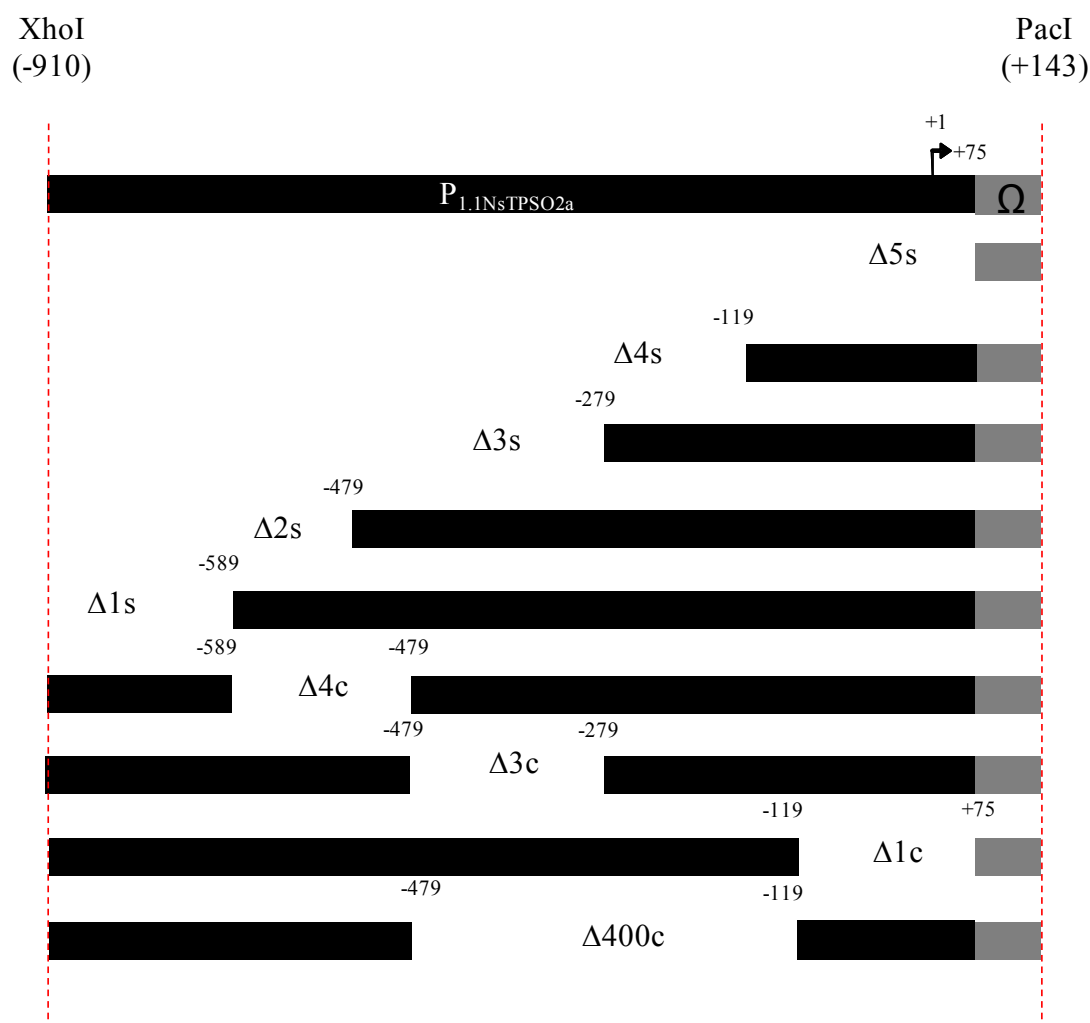
L'analyse du motif 6 (20pb) (Figure 21) suggère l'existence de 3 séquences potentiellement régulatrices. Ainsi, le motif TAACTG (bases 13 à 18) pourrait être reconnu par les protéines de type MYB notamment AtMYB2 impliquée dans la résistance au stress hydrique (Urao *et al.*, 1993) et la protéine MYB.Ph3 de *P.hybrida* impliquée dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes (Solano *et al.*, 1995). Cette dernière s'exprime spécifiquement dans l'épiderme des pétales de *P.hybrida* (Solano *et al.*, 1995). Par ailleurs, la séquence ACACNNG (bases 9 à 15) serait reconnue par les facteurs de transcription de type bZIP PBF 1 et 2. Ces deux protéines interagissent avec deux éléments sur le gène Dc3 de carotte, l'un impliqué dans l'expression du gène dans la réponse à l'ABA et l'autre dans l'expression spécifique du gène dans l'embryon (Kim *et al.*, 1997). Enfin, la séquence ATATT serait impliquée dans l'expression spécifique du gène RolD d'*A.rhizogenes* dans les racines de *Nicotiana* (El Mayan *et al.*, 1995). Cette séquence très bien conservée dans le motif 6 est retrouvée dans le fragment 4c et 400c.

Cette analyse bioinformatique préalable nous a permis de comparer plusieurs promoteurs trichomes spécifiques et ainsi de mettre en évidence des séquences conservées, pouvant correspondre à des éléments *cis* régulateurs. Ces éléments prédictifs ont été pris en compte pour définir les délétions à introduire dans P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> en vue de son analyse fonctionnelle. Grâce à cette analyse nous avons pu générer dix délétions séquentielles et contigües dans le promoteur P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>.

Les promoteurs partiellement délétés ont été fusionnés au gène rapporteur *GUS*. Pour chacune des dix constructions la spécificité d'expression a été analysée en utilisant deux techniques de transformation, de façon transitoire par biolistique dans *N.benthamiana* puis par expression permanente après transgénèse dans *N.sylvestris* ihpNsTPSO2a1.7 (#904).

***III. Analyse fonctionnelle du promoteur 1.1NsTPSO2a in planta***

Les fragments délétés du promoteur P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> sont désignés par un chiffre de 1 à 400 suivi d'une lettre « c » (contigüe) ou « s » (séquentielle). Neuf délétions ont été générées par PCR sur le promoteur : cinq délétions contigües Δ1s (410pb), Δ4c (110pb), Δ3c (200pb), Δ400c (360pb) et Δ1c (190pb) (Figure 22), ainsi que quatre délétions séquentielles Δ5s (1060pb), Δ4s (880pb), Δ3s (720bp), Δ2s (520pb). L'amplification des promoteurs délétés a été faite par des amorces possédant les sites AttB1-XhoI et AttB2-PacI pour permettre l'utilisation du système de clonage Gateway et faciliter le clonage des autres constructions. Le promoteur délété Δ1c a été introduit dans le vecteur pKGWFS7 par Gateway. Puis le vecteur contenant cette délétion a été digéré par les enzymes XhoI et PacI afin d'y introduire par clonage enzymatique les huit autres promoteurs délétés, eux même flanqués des sites XhoI et PacI. L'ensemble des huit délétions a été cloné en amont des gènes rapporteurs *GFP* et *GUS* dans le vecteur d'expression pKGWFS7 (Annexe). Ces constructions ont été utilisées tout le long de l'analyse fonctionnelle du promoteur lors de la transformation par biolistique dans *N.benthamiana* et lors de la transgénèse dans *N. sylvestris*.

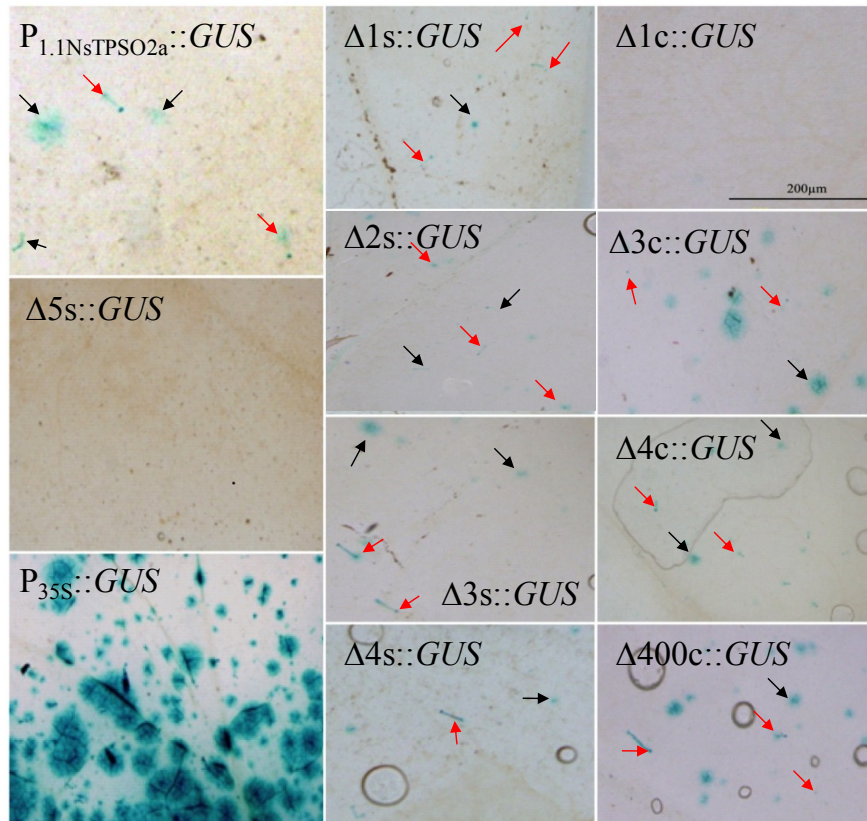


**Figure 22 : Position des délétions séquentielles et contigües sur le promoteur 1.1NsTPSO2a. Délétions séquentielles : Δ5s : 1060pb ; Δ4s : 880pb ; Δ3s : 720pb ; Δ2s : 520pb ; Δ1s : 410pb. Délétions contigües : Δ4c : 110pb, Δ3c : 200pb ; Δ400c : 360pb ; Δ1c : 190pb. Ω : séquence d'augmentation de la traduction (séquence initialement présente dans les constructions fournies par Librophyt).**

Nous avons d'abord analysé l'expression transitoire de la Glucuronidase après biolistique sur *N.benthamiana*. Des essais réalisés sur des disques foliaires de *Nicotiana.sylvestris* ont été infructueux notamment à cause de la fragilité des tissus foliaires, ce qui n'est pas le cas de *N.benthamiana* (Shoko *et al.*, 2009) que nous avons ensuite utilisé. Cette approche a permis de diminuer le nombre de lignées transgéniques à créer et à analyser sur plusieurs générations. Puis, nous avons entrepris l'étude fonctionnelle du promoteur par transgénèse stable dans les lignées sources de *N.sylvestris* (Cf Introduction). Ces lignées n'expriment pas la cembratriène diolsynthase les rendant favorables à la transformation par *A.tuméfaciens* vraisemblablement du fait de l'absence de sécrétion sur les feuilles.

**A. Analyse préliminaire par biolistique**

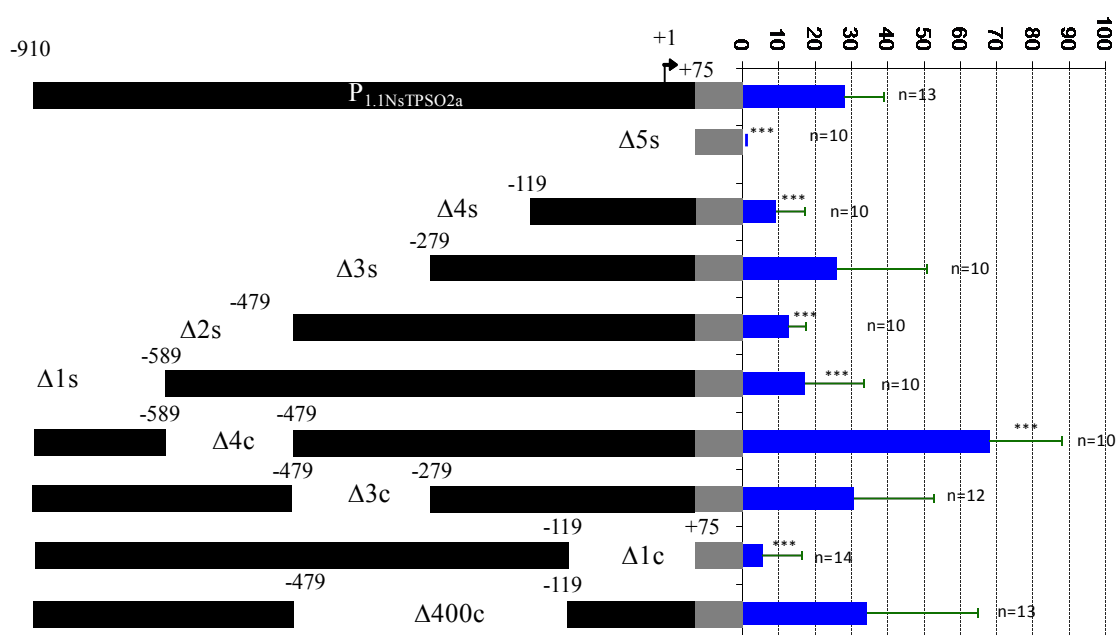
Dans un contexte d'expression transitoire, l'agroinfiltration ne permet pas d'obtenir un profil d'expression incluant les têtes de trichomes. Nous avons donc choisi de déterminer le profil d'expression du promoteur et de ses délétions par biolistique, en réalisant le bombardement de la face adaxiale de disques foliaires de 1cm Ø de *N.benthamiana*. Trois disques ont été bombardés simultanément.



**Figure 23 : Profil d'expression de  $P_{1.1NsTPSO2a}$  et de ses différentes délétions dans les disques foliaires de *N.benthamiana* transformés par biolistique. Le gène rapporteur *GUS* est sous le contrôle du  $P_{1.1NsTPSO2a}$  plus ou moins délété. La coloration a été réalisée sur des disques foliaires de *N.benthamiana* 48h après le bombardement, ces disques ont été placés dans le tampon de coloration sur la nuit, puis décolorés dans un tampon d'éthylalcool. Les photographies ont été réalisées sous loupe binoculaire. Les flèches rouges correspondent aux trichomes colorés et les flèches noires aux spots épidermiques.**

Les observations montrent que l'expression du gène rapporteur est bien localisée dans les trichomes lorsque le gène *GUS* (Figure 23) En revanche la délétion totale du promoteur ( $\Delta 5s::GUS$ ) n'entraîne aucune coloration. Nous remarquons que le profil d'expression des constructions  $\Delta 1s::GUS$ ,  $\Delta 2s::GUS$ ,  $\Delta 3s::GUS$  et  $\Delta 4s::GUS$  montrent également une expression du gène *GUS* dans les trichomes glandulaires (Figure 23).

En revanche, nous remarquerons que le profil d'expression des constructions  $\Delta 1s::GUS$ ,  $\Delta 2s::GUS$ ,  $\Delta 3s::GUS$  et  $\Delta 4s::GUS$  montrent une expression du gène *GUS* dans les trichomes glandulaires (Figure 23). Cette observation a également été faite pour les fragments  $\Delta 3c::GUS$ ,  $\Delta 4c::GUS$ ,  $\Delta 400c::GUS$ . Cependant, comme illustré sur la figure 23, cette coloration n'est pas restreinte aux cellules du trichome que ce soit pour  $P_{1.1NsTPSO2a}::GUS$  ou les différents fragments. En effet, en dehors de  $\Delta 5s::GUS$  et  $\Delta 1c::GUS$ , l'expression du gène rapporteur se retrouve dans des cellules épidermiques (Figure 23). Cette expression se caractérise par des taches irrégulières de taille différentes (flèches noires), indiquant une expression ectopique non spécifique à l'image du profil d'expression du  $P_{35S}::GUS$  mais moins intense. Pour compléter cette analyse qualitative, nous avons procédé à un comptage des trichomes « GUS+ » sur les disques foliaires transformés (Figure 24). Nous avons pu déterminer le nombre moyen de trichomes exprimant le gène rapporteur sur un nombre n de bombardement pour chacune des dix fusions transcriptionnelles. Par ailleurs, un test statistique de contraste (ANOVA I) a été réalisé en comparant le nombre moyen de trichome de chaque construction par rapport à la valeur obtenue pour  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . Cela nous a permis d'estimer si les différences relatives étaient significatives ou non par rapport à la valeur de  $P_{1.1NsTPSO2a}$ .



**Figure 24 : Nombre moyen de trichome exprimant le gène *GUS* pour chaque délétion du  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . Le comptage du nombre de trichomes colorés s'est fait sur 3 disques foliaires/bombardement, n représente le nombre d'évènements (bombardement) indépendants pour chaque construction. Le test ANOVA I a permis de mettre en évidence les valeurs ayant une différence significative (astérisques) par rapport à la valeur obtenue pour  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . Le panneau de gauche représente les différentes délétions effectuées sur le  $P_{1.1NsTPSO2a}$ .**

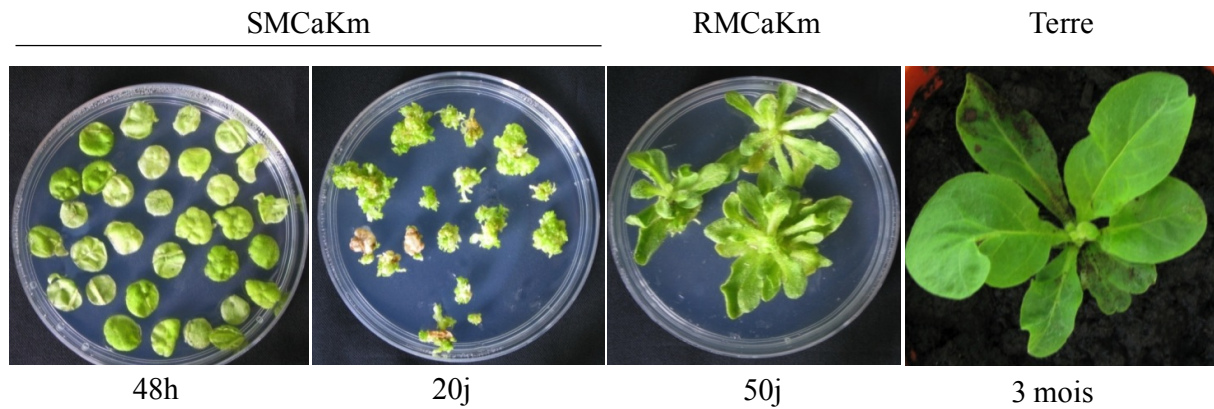


Alors qu'aucun trichome coloré n'a été observé pour la construction  $\Delta 5s::GUS$ , 28 trichomes en moyenne sont colorés lorsque 13 bombardements sont réalisés avec  $P_{1.1NsTPSO2a}::GUS$ . Pour l'ensemble des autres constructions, nous remarquons que l'expression du gène rapporteur est présente dans les trichomes. Le test statistique de contraste nous montre que la différence n'est pas significative pour  $\Delta 3s$ ,  $\Delta 3c$  et  $\Delta 400c$  (Figure 24). En effet, leur moyenne est comparable avec celle de  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . Une différence significative est observée pour la construction  $\Delta 4s$  avec un nombre de trichomes bleus de 9. De même, nous remarquons une diminution à 13 et 18 trichomes bleus pour  $\Delta 2s$  et  $\Delta 1s$  respectivement. Deux délétions internes  $\Delta 1c$  et  $\Delta 4c$  ont un profil statistique différent de  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . En effet, le nombre de trichomes bleus passe de 28 ( $P_{1.1NsTPSO2a}$ ) à 68 pour  $\Delta 4c$ . De même, seulement 5 trichomes sont colorés quand les disques sont transformés par  $\Delta 1c::GUS$  (Figure 24).

En conclusion, les données obtenues par l'analyse biolistique semblent indiquer qu'il n'existe pas d'élément unique responsable en totalité de la spécificité d'expression dans les trichomes glandulaires dans nos conditions expérimentales malgré le résultat obtenu pour  $\Delta 4c$ . De même, l'élément 4s semble suffisant pour une expression trichome spécifique. Grâce à l'analyse par biolistique, nous avons pu réduire à 7 le nombre de constructions pour réaliser l'analyse fonctionnelle du  $P_{1.1NsTPSO2a}$  dans *N.sylvestris* par transgénèse stable. Parmi elles  $\Delta 1c$ ,  $\Delta 4c$ ,  $\Delta 3c$  et  $\Delta 400c$ , qui sont les délétions qui couvrent les trois motifs prédits sur MEME. Les délétions  $\Delta 2s$ ,  $\Delta 3s$  n'ont pas été retenue pour l'étude par transgénèse puisque ces délétions sont couvertes respectivement par les délétions  $\Delta 4c$  et  $\Delta 3c$ . D'après cette analyse l'élément 4s semble suffisant pour une expression trichome spécifique.

**B. Analyse de  $P_{1.1NsTPSO2a}$  par transformation stable dans *N.sylvestris*  
*ihpNsTPSO2a1.7***

Pour la transformation des différents promoteurs délétés fusionnés au gène rapporteur, nous avons utilisé la transgénèse par culture de tissus et régénération pour étudier l'expression stable des fusions transcriptionnelles (Figure 25). Les transformations des explants foliaires ont été réalisées avec le vecteur de type pKGWFS7 via *Agrobacterium* dans la lignée source où l'expression du gène *NsTPSO2a* est éteinte (#904).

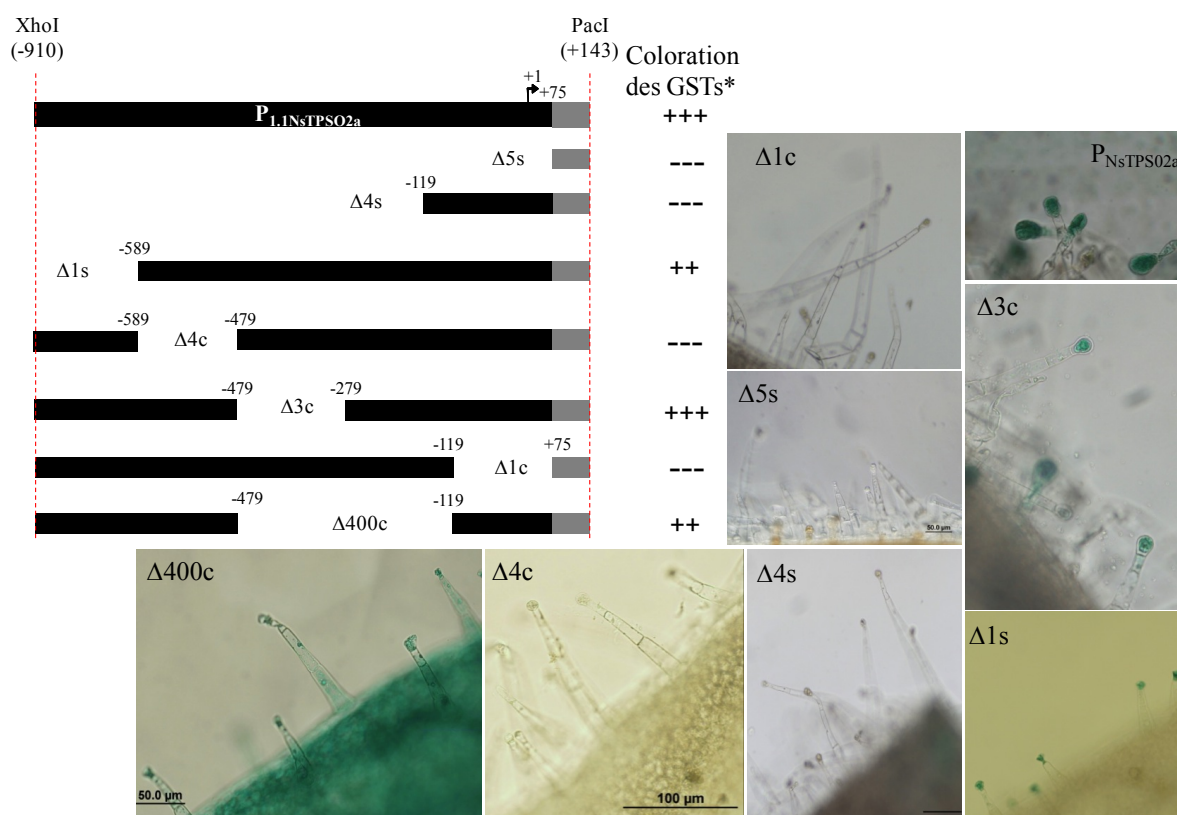


**Figure 25: Régénération de cals après transgénèse via *A.agrobacterium* dans la lignée source #904.**

Les disques foliaires transformés sont placés sur des milieux de différenciation foliaire (SMCarb<sup>R</sup>Kana<sup>R</sup>). Les cals apparaissent à la périphérie du disque. Ils sont placés sur ce milieu jusqu'à apparition des feuilles. Ces jeunes feuilles sont ensuite placées sur un milieu de différenciation racinaire (RMCarb<sup>R</sup>Kana<sup>R</sup>). Enfin, au bout de 3 mois de culture in vitro, les plantes sont transférées en terre.

Après trois mois de culture in vitro, nous avons obtenus la régénération des lignées transformées indépendantes T0 dont le nombre varie de 1 à 8 en fonction des constructions (Annexe). Cent graines de l'ensemble des 36 lignées ont été sélectionnées une première fois sur un milieu supplémenté en kanamycine. Les plantules T1 résistantes ont été ensuite transférées en terre. Le profil d'expression de ces lignées a été analysé par coloration GUS.

Conséquences des délétions de *P1.1NsTPSO2a* sur son profil d'expression par transformation stable dans les tabacs transgéniques.



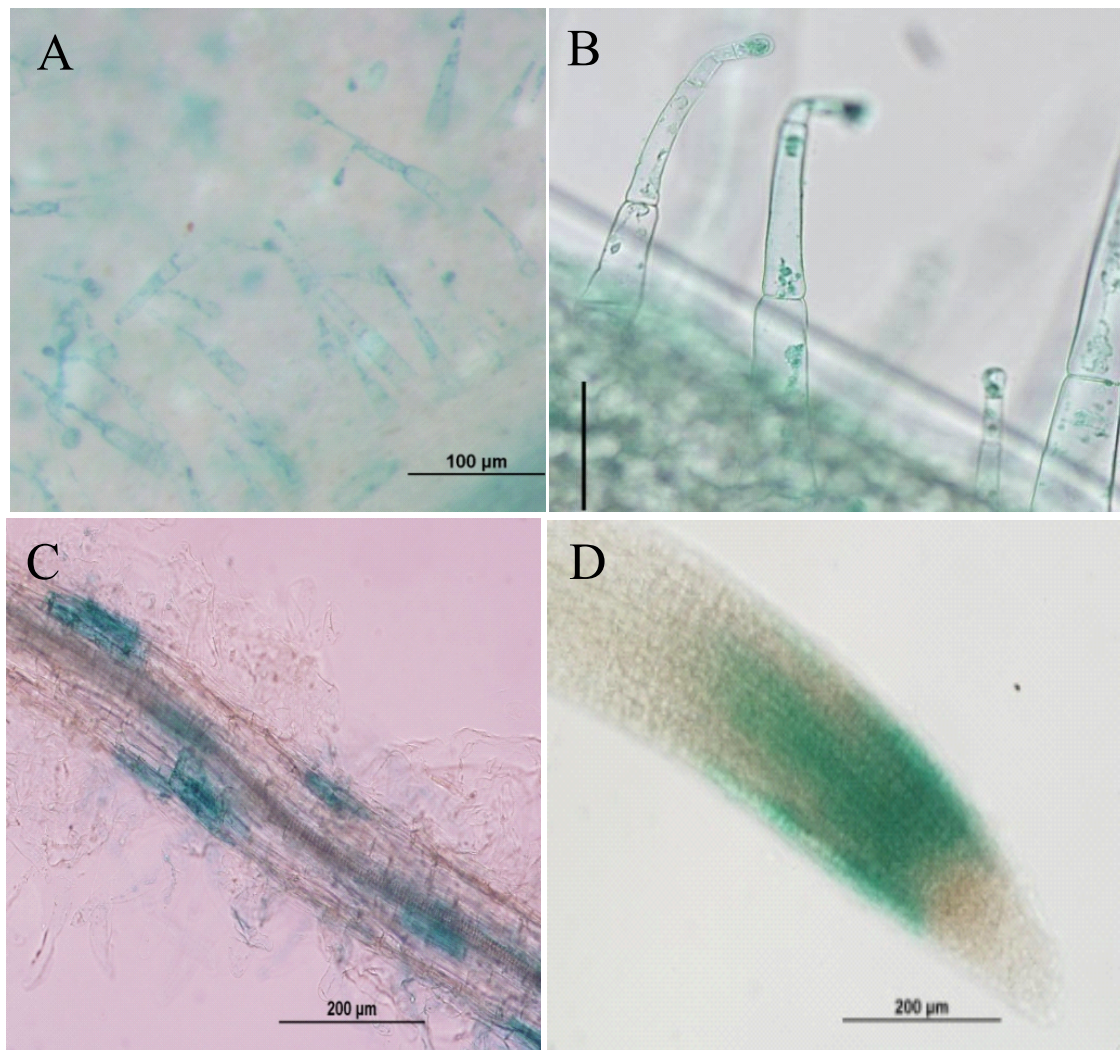
**Figure 26 : Profils d'expression des 7 transgènes  $\Delta s/c::GUS$  dans la lignée source *N.sylvestris*. Le gène rapporteur *GUS* est sous le contrôle de différents fragments délétés du  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . La coloration a été faite sur des plantules T1 au stade 1 paire de feuilles sélectionnées sur un milieu supplémenté en kanamycine. Les plantules ont été placées dans le tampon de coloration sur la nuit, fixées et décolorées dans un tampon hoey's. \* Glandulars Secretory Trichomes.**

Dans la lignée contrôle(+)  $P_{1.1NsTPSO2a}$ , l'expression se caractérise par une coloration spécifique dans les têtes des TGSs dans les plantules T2 comme décrit dans le paragraphe I (Figure 26). Un profil d'expression comparable est visualisé pour les lignées transformées par  $\Delta 1s$  et  $\Delta 3c$  (Figure 26). Ce résultat a été obtenu pour 5 lignées indépendantes pour les deux constructions  $\Delta 1s$  et  $\Delta 3c$ . Ceci semble indiquer que la délétion du fragment de 1s (410pb) et 3c (200pb) n'influe en aucun cas sur la spécificité d'expression du promoteur et ne contient donc pas d'éléments régulateurs essentiels (Figure 26). Comme attendu, la lignée contrôle négatif  $\Delta 5s$  dans laquelle l'ensemble du promoteur 1,1kb est délété, n'exprime pas le gène rapporteur ni dans les tissus épidermiques ni dans les trichomes (Figure 26).

Ce résultat a été observé sur 5 lignées indépendantes de plantes. De même, une absence de coloration a été observé pour les plantes transformées par  $\Delta 1c$ ,  $\Delta 4s$  et  $\Delta 4c$  (Figure 26). Dans le cas de la délétion du fragment 1c (190pb), la TATA box située à 35pb en amont du +1 de transcription a été délété expliquant cette absence de coloration. Le résultat obtenu pour la délétion  $\Delta 4s$  montre une absence de coloration dans les plantules des 4 lignées obtenues. Enfin, pour  $\Delta 4c$  aucune coloration n'a été observée dans la tête des trichomes et ce pour les 6 lignées indépendantes observées (Figure 26). Ainsi, il semble que le fragment qui a été délété soit indispensable à l'expression spécifique dans les têtes de trichomes.

En résumé, ces trois différentes constructions  $\Delta 1c$ ,  $\Delta 4s$  et  $\Delta 4c$  indiquent que la région - 589pb et -479pb (délétion  $\Delta 4c$ ) un élément activateur de  $P_{1.1NsTPSO2a}$  dans la tête du trichome glandulaire de *N.sylvestris*.

Le profil d'expression de la délétion  $\Delta 400c$  (360pb) est tout à fait particulier, avec d'une part une coloration diffuse de la tête des trichomes jusqu'aux cellules du pied et d'autre part une coloration éparse au niveau de l'épiderme foliaire (Figure 26, 27A et 27B). Ainsi, il semble que cette construction montre une perte de spécificité d'expression. La délétion  $\Delta 3c$ , contenue dans la délétion  $\Delta 400c$  montre un profil d'expression comparable à celui de  $P_{1.1NsTPSO2a}$  (Figure 26). Ce résultat suggère que le fragment complémentaire (-279 à -119) contient probablement un élément activateur alors que le fragment 3c contiendrait un élément cis répresseur du  $P_{1.1NsTPSO2a}$  dans les cellules épidermiques. Malgré plusieurs tentatives nous n'avons pas réussi à réaliser la délétion -279 à -119 qui correspondait à la délétion  $\Delta 2c$ .

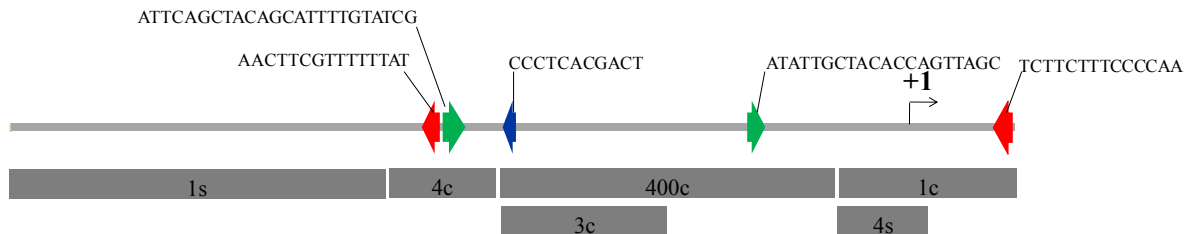


**Figure 27 : Profil d'expression de  $\Delta 400c::GUS$  dans les racines. A et B : Expression de la construction  $\Delta 400c::GUS$  dans les trichomes et les cellules de l'épidermes. C et D : Expression de la construction  $\Delta 400c::GUS$  dans les cellules racinaires et dans l'extrémité racinaire. Les photographies ont été prises au microscope optique.**

Enfin, nous avons également observé une coloration dans les racines de certaines lignées de  $\Delta 400c$  (Figure 27C et 27D). Cela suggère donc que ce fragment renferme un ou des élément(s) qui seraient responsables de la répression du  $P_{1.1NsTPSO2a}$  dans les cellules autres que les cellules des têtes TGSs.

En conclusion, l'observation des lignées transgéniques suggère que les éléments responsables de l'activité spécifique de  $P_{1.1NsTPSO2a}$  sont contenus dans les deux fragments 4c et 400c. Ces observations ne contredisent pas les analyses informatiques effectuées avec MEME (Figure 20 et 21). En effet, la comparaison des motifs prédits par MEME et des éléments 4c et 400c montrent que les motifs prédits sont recouverts par les séquences 4c et 400c (Figure 28).

Ainsi le motif 6 est retrouvé à la fois sur le 4c et le 400c (2c). Le motif 1 est retrouvé dans la séquence 4c seulement alors que le motif 5 est retrouvé dans la séquence 400c (3c) (Figure 28).



**Figure 28 : Alignement des motifs prédits par MEME et les fragments délétés du  $P_{N_sTPSO2a}$**

Les motifs 1,5 et 6 sont respectivement représentés par une flèche rouge, bleue et verte sur la séquence. La position de chaque motif est déterminée à partir de l'extrémité 3' du promoteur.

### **C. Analyse fonctionnelle des fragments 4c et 400c**

Les fragments 4c (110pb) et 400c (360 pb) semblent être responsables de la spécificité d'expression de  $P_{1.1N_sTPSO2a}$  dans les TGSs de *N.sylvestris*. Pour confirmer les résultats, nous avons fusionné ces fragments à un promoteur minimum afin de déterminer si ces éléments sont suffisants pour reproduire le profil d'expression de  $P_{1.1N_sTPSO2a}$ . Le promoteur minimum choisi a été la région -46 du 35S du CaMV comme indiqué dans la figure 29. Pour ne pas introduire de variations supplémentaires par rapport aux analyses précédentes, nous avons conservé la séquence nucléotidique omega dans ces constructions.



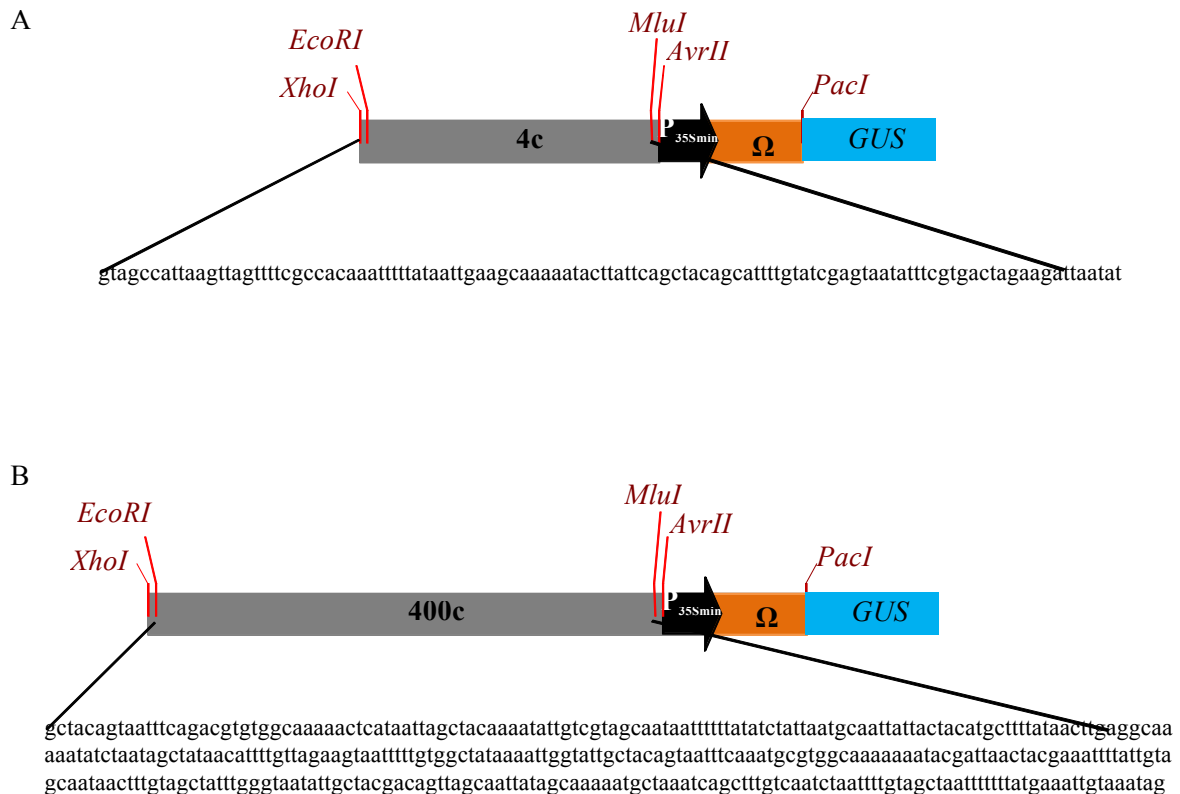


Figure 29 : Fusions transcriptionnelles des éléments 400c et 4c au P<sub>35Smin</sub>.

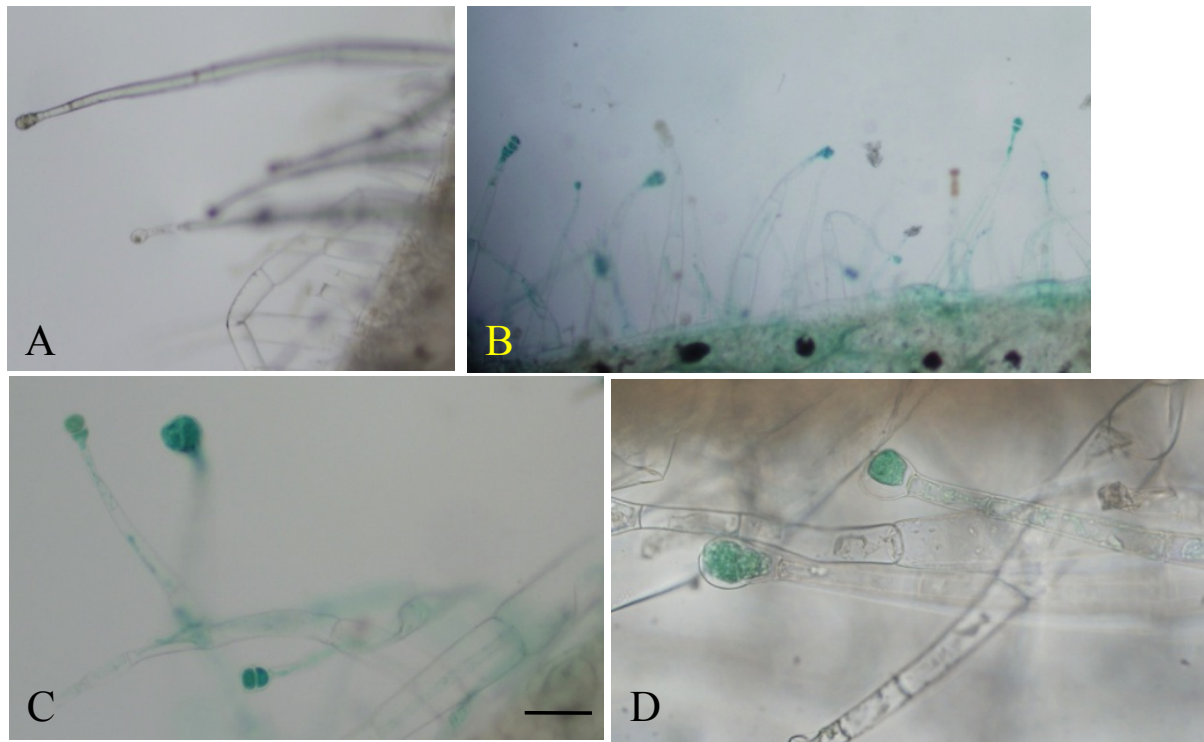
L'assemblage des éléments a été réalisé grâce aux sites de restrictions. Le P<sub>35Smin</sub> (46pb) est cloné en aval de la séquence d'intérêt. Il est séparé de l'ATG du gène rapporteur par une séquence régulatrice de la traduction Ω (70pb). Les fragments 4c (110pb) (A) et 400c (360pb) (B) ont été obtenus par PCR en utilisant des oligonucléotides contenant les sites de restriction indiqués. L'ensemble est cloné dans le vecteur d'expression pKGWFS7.

Ces constructions ont été transférées par transgénése dans la lignée source *RNAi* NsTPSO2a1.7. Cinq lignées indépendantes ont été obtenues pour 4c et deux pour 400c. Par ailleurs, une construction contrôle P<sub>35Smin</sub>::*GUS* a été réalisée et transformée dans le même fond génétique.

### 1. Fonctionnalité du fragment 4c

Lorsque le promoteur 35Smin (P<sub>35min</sub>) seul est utilisé, aucune expression n'est détectable dans les trichomes et dans les cellules épidermiques (Figure 30A) des trois lignées observées. Ceci confirme l'absence d'activité de ce promoteur. En revanche, une activité GUS est observée chez 3 des 5 lignées indépendantes transformées par la fusion 4c::P<sub>35Smin</sub>::*GUS*. Seule une lignée sur les trois a produit des graines.

Cette coloration est localisée en majorité dans les têtes des trichomes glandulaires (Figure 30B). Cependant, on observe également une plus faible coloration au niveau de l'épiderme et au niveau des pieds des TGSs. (Figure 30B). Un détail au fort grossissement montre cette coloration au niveau des cellules des têtes ainsi qu'une faible coloration du pied (Figures 30C et 30D).



**Figure 28 : Profil d'expression de la construction 4c::P<sub>35Smin</sub>::GUS.**

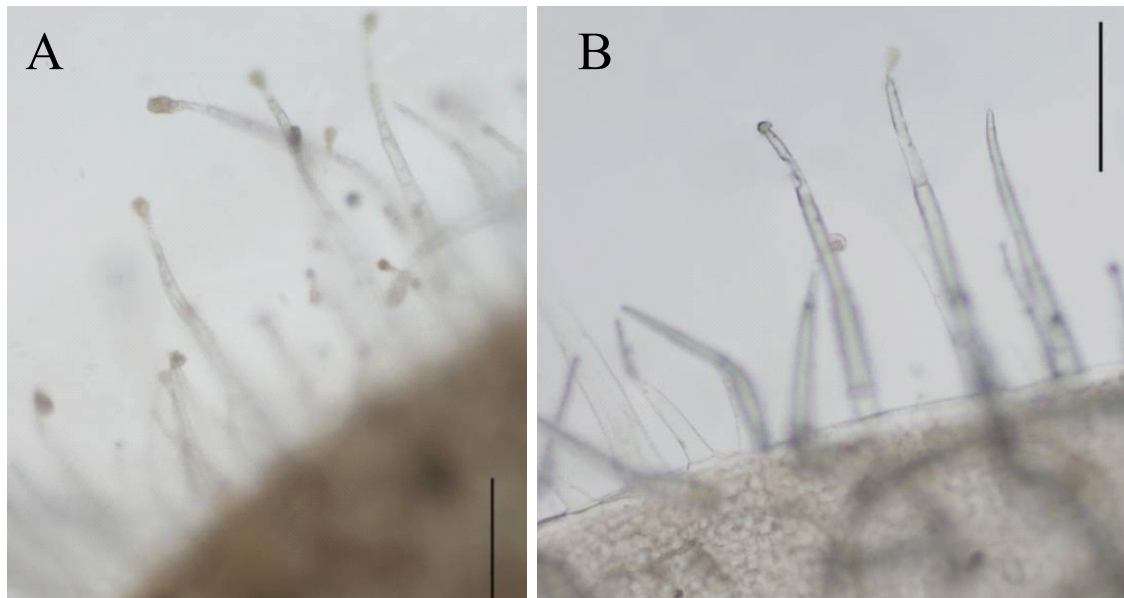
**La coloration a été faite sur 1 paire de feuilles de plantules T1. Les feuilles ont été placées dans le tampon de coloration sur la nuit, fixées et décolorées dans un tampon Hoyer's. A : P<sub>35Smin</sub>::GUS. B, C et D : 4c::P<sub>35Smin</sub>::GUS. Pour C et D la photographie est focalisée sur les trichomes glandulaires. Longueur de la barre : 100µm (A) et 50µm (C).**

Ainsi, la fusion du fragment 4c en amont du promoteur P<sub>35Smin</sub> permet une restauration de la spécificité d'expression dans les trichomes. Cette activation a lieu essentiellement dans les cellules de tête du trichome glandulaire bien que les cellules du pied et les cellules épidermiques présentent une faible coloration. Ceci confirme donc le résultat de l'approche par délétions. La région, 4c de 110 pb contient un élément activateur de l'expression du P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> puisque cet élément seul est suffisant pour permettre une activation spécifique du promoteur P<sub>35Smin</sub>.



## 2. Fonctionnalité de la région 400c

Aucune activité GUS n'a été observée pour le contrôle  $P_{35Smin}::GUS$  (31A). Lorsque la région 400C est fusionnée au  $P_{35Smin}$ , l'activité de la  $\beta$ -Glucuronidase n'est pas détectée dans les trichomes des 3 lignées transgéniques indépendantes obtenues, ni dans les cellules épidermiques (Figure 31B).



**Figure 31 : Profil d'expression de la construction 400c:: $P_{35Smin}::GUS$ .**

**La coloration a été faite sur 1 paire de feuilles de plantules T0. A :  $P_{35Smin}::GUS$ , B : 400c:: $P_{35Smin}::GUS$ .**

**Les photographies sont dirigées sur les trichomes glandulaires. Longueur de la barre : 100 $\mu$ m**

Ceci nous suggère la présence d'un élément cis répresseur dans le fragment 400c.

## ***IV. Conclusion***

L'analyse fonctionnelle des promoteurs est devenue une étape incontournable pour mieux connaître la spécificité d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des terpènes chez les plantes (Yin *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2002 ; Suttipanta *et al.*, 2007). Cette recherche de connaissance est faite dans un but biotechnologique. Au cours de l'analyse informatique de  $P_{1.1NsTPSO2a}$ , nous avons mis en évidence des éléments-cis conservés dans les promoteurs spécifiques des trichomes de deux espèces de Solanacées.

Par ailleurs, nous avons confirmé expérimentalement l'activité spécifique de  $P_{1.1N_sTPSO2a}$  dans les cellules sécrétrices des TGSs de *N. sylvestris*. L'analyse de l'expression de  $\Delta 3c::GUS$ ,  $\Delta 1s::GUS$  a montré le même profil que  $P_{N_sTPSO2a}$ .

En revanche, une perte d'expression spécifique pour  $\Delta 5s::GUS$ ,  $\Delta 4s::GUS$ ,  $\Delta 1c::GUS$ ,  $\Delta 4c::GUS$ ,  $\Delta 400c::GUS$  a été observé. L'analyse du profil de  $\Delta 400c::GUS$  a montré une dérépression de l'expression du gène GUS dans les cellules épidermiques alors qu'une absence d'expression a été notée pour  $\Delta 4c::GUS$ . Enfin la fusion de 4c à  $P_{35Smin}$ , nous a permis d'observer que le fragment 4c est suffisant pour apporter une expression dans le trichome bien que la restriction de l'expression aux cellules sécrétrices de têtes ne soit pas totale. Ainsi des éléments répresseurs additionnels en dehors du fragment 4c sont doute requis pour mimer totalement l'activité du promoteur entier. Ces éléments répresseurs pourraient être porté par le fragment 400c. Ces expériences confirment que les deux fragments 4c et 400c portent des éléments-cis régulateurs pour permettre l'expression spécifique dans les cellules glandulaires des TGSs de *N.sylvestris*.

## ***Chapitre II : Recherche d'un facteur trans-régulateur du $P_{1.1NsTPSO2a}$ dans le trichome***

Comme dans le cas des promoteurs régulés, le contrôle de l'initiation de la transcription de *NsTPSO2a* nécessite une activation par des facteurs de transcription capables d'activer ou de réprimer le complexe d'initiation de la transcription. Le deuxième volet de mes travaux de recherche a porté sur la caractérisation d'un ou plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du  $P_{1.1NsTPSO2a}$ . Le but en termes de biotechnologie serait de surexprimer ce facteur pour qu'il puisse se fixer sur l'élément cis-activateur concatémérisé et placé en amont du gène d'une enzyme de biosynthèse des terpènes. Aussi, dans le but de caractériser ce ou ces facteurs, nous avons choisi de mettre en œuvre un crible simple hybride dans la levure. Le simple hybride est une technique de biologie moléculaire, variante de la technique de double hybride. Elle permet de mettre en évidence une interaction entre une protéine se liant à l'ADN et une séquence cible d'ADN. Le domaine activateur de la transcription du facteur Gal4 est fusionné avec la protéine d'intérêt afin de lui conférer une activité d'activation de transcription même s'il s'agit d'un répresseur. On transfecte ensuite un gène rapporteur comme *His3* placé sous contrôle de la séquence cible d'ADN. Si la protéine interagit avec la séquence, le domaine activateur de GAL4 pourra activer la transcription du gène rapporteur, ce qui provoque la croissance des levures sur milieu sélectif.

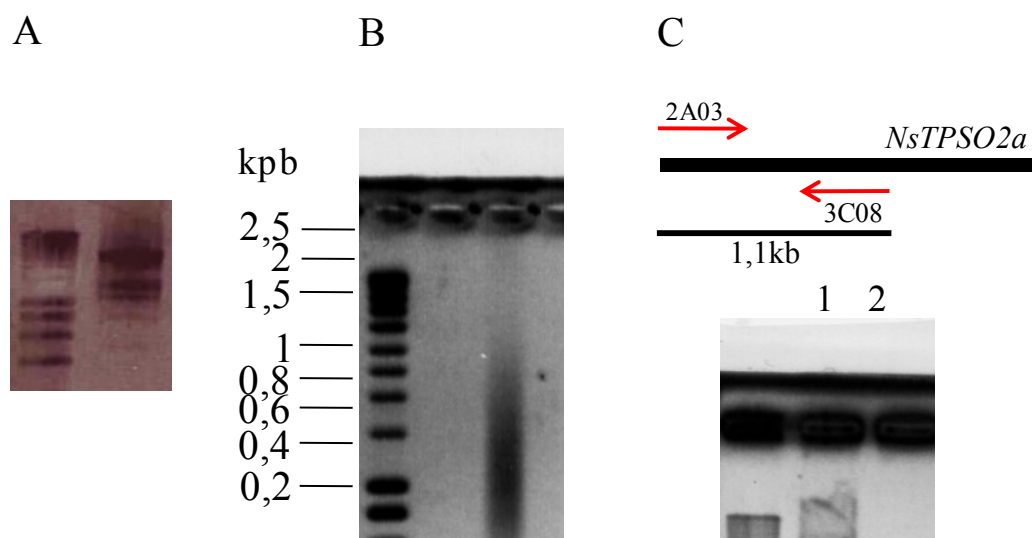
### ***I. Construction de la banque d'ADNc pleine longueur de TGSs de *N.sylvestris****

#### ***A. Amplification et clonage d'une banque d'ADNc pleine longueur***

Librophyt nous a fourni des ARN totaux extraits des trichomes de *N.sylvestris* (Figure 32A). Le premier objectif ici a été d'obtenir des fragments d'ADNc d'au moins 1kb pour avoir des protéines complètes. Aussi, nous avons utilisé le kit Matchmaker™ One-Hybrid Library Construction & Screening Kit (Clontech). Le principe de ce kit est basé sur l'addition par RT-PCR de deux adaptateurs SMARTIII et CDSIII en 5' et 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le fragment amplifié est ensuite intégré au vecteur pGADT7Rec par recombinaison via les adaptateurs (SMARTIII et CDSIII) lors de la co-transformation avec le vecteur cible pHis2.1 dans la levure (souche Y187) qui porte le fragment cis.

La pleine longueur de nos fragments d'ADNc par PCR a été contrôlée en utilisant des oligos spécifiques du gène *NsTPSO2a* (Figure 32C). Après la recombinaison, une trentaine de clones a été digérée par *SmaI* pour vérifier la taille des inserts.

Les ARN totaux (Figure 32A) n'ont pas dégradés puisque nous visualisons les ARNr 26S, 18S et 5S. L'amplification par la technologie SMART montre une traînée ('smear') d'ADN allant de 0,4 kpb à 2,5 kpb suggérant l'amplification d'ADNc de grande taille (Figure 32B). Enfin, une amplification de contrôle par PCR sur ces ADNc a permis de montrer que le transcrit du gène *NsTPSO2a* possède bien la taille attendue de 1,1kpb (Figure 32C). Ces contrôles démontrent la qualité des ARN et ADNc produits.



**Figure 32 : Contrôle qualité des ADNc de trichomes de *N.sylvestris*.**

**A : ARN totaux de trichomes de *N.sylvestris* ; B : ADNc obtenu par le kit Matchmaker ; C : Amplification du gène *NsTPSO2a* spécifique de trichomes, 1 : ADNc *NsTPSO2a* ; 2 : Contrôle négatif.**

Le clonage des ADNc dans le vecteur pGADT7Rec2 (Annexe) se fait par recombinaison dans la levure via les adaptateurs SMART et CDS pendant la cotransformation des ADNc et du vecteur pGADT7Rec2. Ce clonage préalable nous a permis de déterminer la taille des inserts après digestion enzymatique par *Sma*I. Les plasmides de douze colonies sélectionnées sur milieu minimum ont été digérés par *Sma*I. A l'exception d'un clone, la taille des inserts est inférieure à 0,2 kb (Figure 33B).

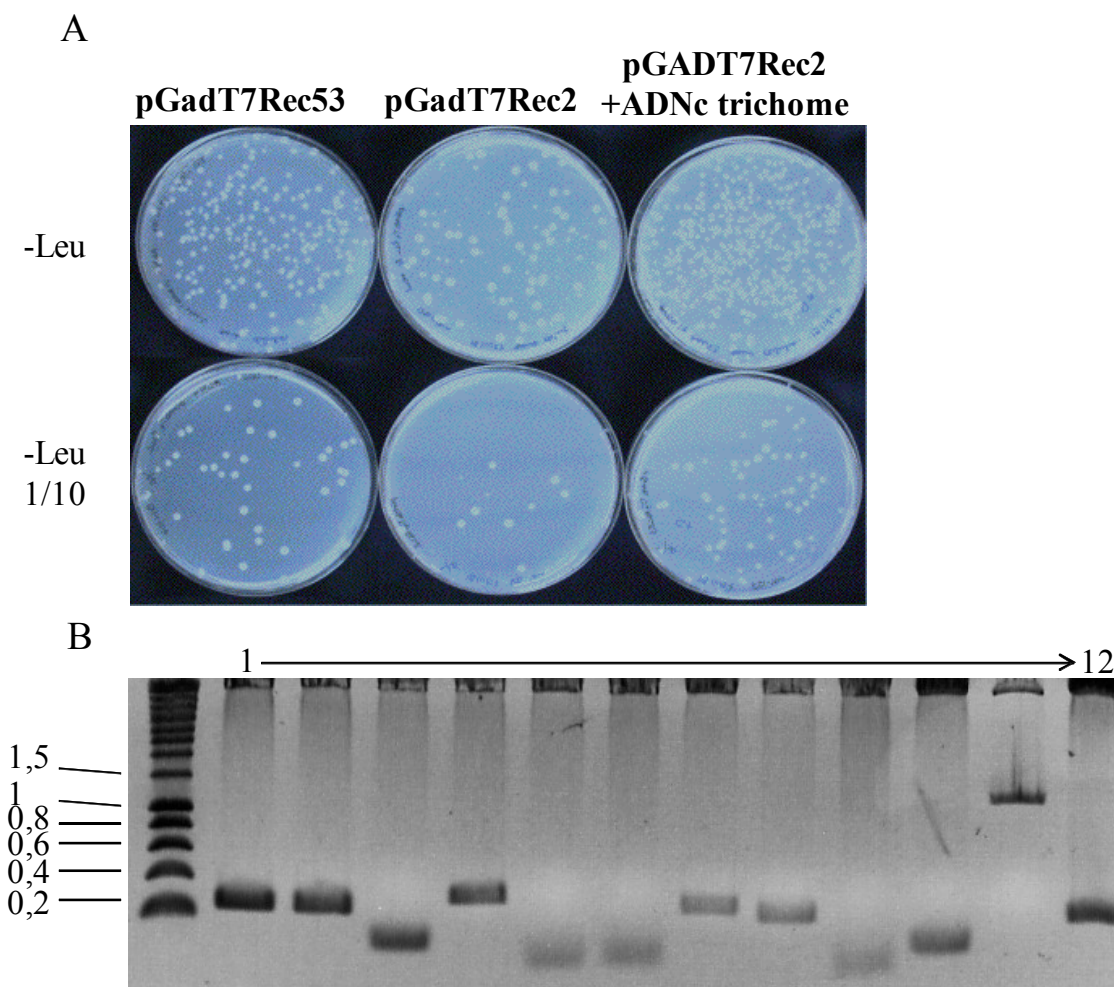


Figure 31 : Clonage de la banque d'ADNc dans pGADT7Rec2.

A : 1µg d'ADNc ont été cotransformés avec 0,3µg de pGADT7Rec2. Les levures ont été sélectionnées sur un milieu SD-Leu. 1/10 indique que les levures ont été diluées dix fois avant d'être étalées. B : 12 colonies de levures ont été sélectionnées. Les plasmides ont été purifiés et retransformés dans *E coli* (XL1blue) puis extraits et digérés par SmaI pour vérifier la taille des inserts.

Face à la faible taille des inserts, nous avons choisi de sélectionner les fragments de grande taille en éliminant les amplicons dont la taille est inférieure à 0,6 kb. Pour ce faire, nous avons procédé à la fragmentation de taille des ADNc sur gel d'agarose et à un clonage par recombinaison des fragments dans le vecteur pGADT7Rec2. Ce clonage a été réalisé *via* les adaptateurs SMART et CDS des ADNc amplifiés. Une nouvelle transformation de levure a été réalisée. Suite à la sélection des clones, la digestion par SmaI a révélé des inserts dont la taille était à nouveau inférieure à 1 kpb. Ceci indique donc que le kit Clontech sélectionne des fragments de petites tailles. De nombreux contrôles ont été réalisés avant d'en arriver à ce constat. Aussi, nous avons décidé d'abandonner cette méthode de construction de banque et de sous-traiter la construction d'une banque conventionnelle au fournisseur Clontech.

**B. Recherche de facteur de transcription se liant aux éléments 4c et 400c par crible simple hybride**

La banque d'ADNc de trichomes a été réalisée dans le vecteur pGADT7RecAB. Comme dans le vecteur pGADT7Rec2, les ADNc sont fusionnés au domaine activateur (AD) du facteur de transcription de levure GAL4. Le vecteur d'expression possède le gène d'auxotrophie *LEU2*. Le titre de la banque, dans la souche bactérienne DH10B, était  $> 10^8$  cfu/ml. Le nombre de clones indépendants avant amplification était de  $3,2 \cdot 10^6$ .

**C. Recherche de candidats reconnaissant le fragment 400c**

La souche Y187 est HIS<sup>-</sup> et le vecteur pH400c, issu de pHIS2.1 porte le gène marqueur d'auxotrophie *HIS3* sous le contrôle de son promoteur minimum et de l'élément cis 400c (Figure 34). Le milieu de sélection utilisé est donc dépourvu d'histidine, de leucine et de tryptophane. Afin de cerner les conditions du crible à grande échelle, nous avons procédé à des tests de croissance des levures transformées par les 2 vecteurs sur concentrations croissantes (0, 20, 50, 60 et 75mM) d'inhibiteur compétitif 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT). Les conditions du crible ont été fixées à 75m M de 3-AT et 3 jours de croissance sur milieu SD-Leu<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>His<sup>-</sup>. Dans ces conditions aucune colonie n'est visible.



**Figure 34 : Vecteur pH400c utilisé pour le crible simple hybride.**

La région 400c du P<sub>35min</sub> NsTPSO<sub>2a</sub> a été placée en amont du gène de sélection *HIS3* et de son promoteur minimum. Cette construction a été transformée dans la souche de levure Y187 -HIS pour réaliser le crible simple hybride.

Les levures ne poussent sur le milieu de sélection que si une protéine est capable de se lier à la séquence 400c et si le domaine Gal4 active la transcription du gène *HIS3*. La sélection des levures sur le milieu -LEU-HIS-TRP a permis d'isoler 13 clones sur  $3 \cdot 10^6$  colonies (estimation faite sur un milieu riche après cotransformation de la banque et du pH400c) après 3 jours de croissance à 30°C. Les inserts ont été digérés du vecteur pGADT7RecAB par SfiI et vérifiés sur gel. Les clones ont été retransformés dans la levure et séquencés. Ces 13 clones contiennent tous un ADNc différent et codent des protéines différentes. (Tableau II).

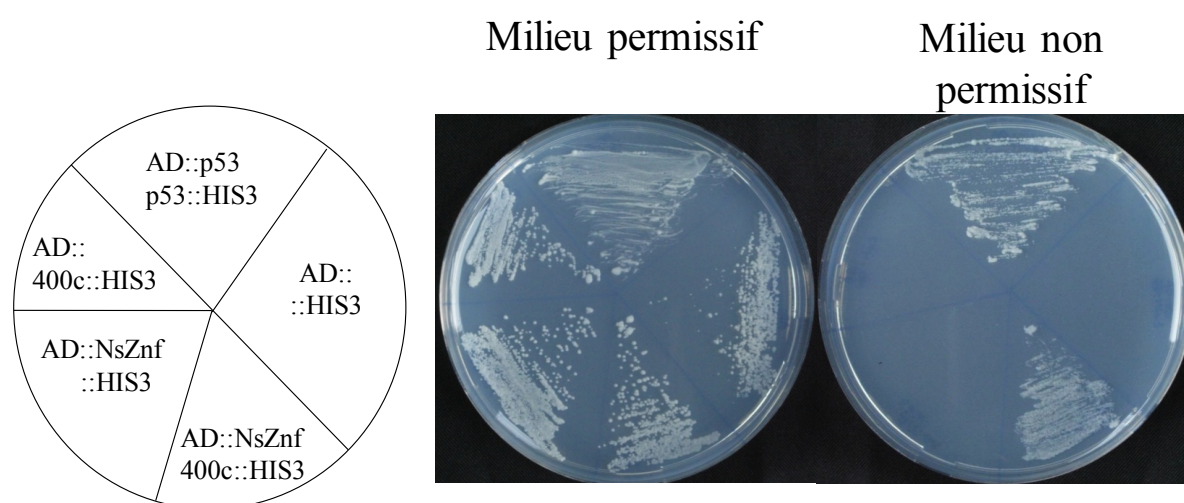
<i>Clone</i>	<i>Numéro d'accension</i>	<i>Nomination</i>	<i>E value</i>	<i>Similarité</i>
2.1	ACN76475	CBL-interacting protein kinase 25 <i>Populus euphratica</i>	5e <sup>-65</sup>	123/146
3.1	AAF91469	putative vacuolar proton ATPase subunit E <i>L. esculentum</i>	5e <sup>-54</sup>	111/127
4.1	NP_001147027	polyubiquitin containing 7 ubiquitin monomers <i>Zea mays</i>	5e <sup>-81</sup>	156/156
12.2	XP_002333412	predicted protein <i>Populus trichocarpa</i>	3e <sup>-07</sup>	30/38
13.2	ABH01084	putative ROX1 <i>Nicotiana tabacum</i>	2e <sup>-42</sup>	138/156
14.2	CAI84657	hypothetical protein <i>Nicotiana tabacum</i>	7e <sup>-88</sup>	160/169
6.1	AT3G21175	ZML1 (ZIM-LIKE 1); transcription factor <i>Arabidopsis thaliana</i> , TIFY2A, ZIM-LIKE 2, ZML2)	2e <sup>-04</sup>	136/186
6.2	EEF44983	ATP binding protein, <i>R. communis</i>	5e <sup>-59</sup>	71/116
7.1	EEF42980	Protein C9orf78, putative <i>R. communis</i>	1e <sup>-79</sup>	172/284
7.2	AT3G14080.2	small nuclear ribonucleoprotein	3e <sup>-45</sup>	107/128
8.1	AF151216.1	<i>N. glauca</i> cell-type guard cell proline-rich protein (GPP1) mRNA	5e <sup>-66</sup>	163/193
9.1	AY497478.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH7 (XTH7) mRNA, complete cds	9e <sup>-138</sup>	233/274

**Tableau II : Description des 13 clones issus du crible simple hybride 400c :**

**Les ADNc des 13 clones ont été séquencés puis alignés sur les bases de données nucléiques et protéiques de NCBI et TAIR. La similarité indique le nombre d'acides aminés identiques entre la séquence du clone isolé et celle de la protéine la plus proche dans les bases de données.**



Parmi les 13 clones sélectionnés, seul le 6.1 code un facteur de transcription portant un doigt de zinc (Tableau II) et que nous appellerons NsZnf (*Nicotiana sylvestris* Zincfinger). La séquence nucléotidique du clone 6.1 a une longueur de 1067pb. Le logiciel VectorNti (Invitrogen) a détecté une ORF de 1050pb comprise entre un ATG (18pb) et un codon stop TAA (849pb). Pour confirmer la spécificité d'interaction de ce clone avec la séquence 400c, nous avons retransformé l'ADNc dans la même souche de levure utilisée pour le crible simple hybride (Figure 35). Différents contrôles ont été utilisés lors de cette expérience (Figure 35).



**Figure 35 : Interaction spécifique de la protéine NsZnf avec 400c dans la levure**

Les stries ont été réalisées à partir de culture liquide ( $DO_{600}=0,2$ ). Le milieu permissif : SD-LEU-TRP et le milieu non permissif : SD-LEU<sup>-</sup>TRP<sup>-</sup>HIS<sup>-</sup>+75 mM 3AT.

La croissance des levures des différentes cultures n'est pas affectée sur milieu permissif. En revanche, en dehors du contrôle positif p53::AD /p53::HIS3 (p53 interagit spécifiquement avec un élément cis placé en amont de *HIS3* sur le vecteur p53::HIS3) et de AD::NsZnf/400c::HIS3, aucun des contrôles négatifs ne poussent sur milieu non permissif. Cette observation semble confirmer une interaction spécifique entre NsZnf et la séquence 400c du P<sub>1.1</sub>NSTPSO2a (Figure 35).

## II. La protéine NsZnf possède un domaine d'interaction à l'ADN

### A. Analyse bioinformatique de la protéine NsZnf

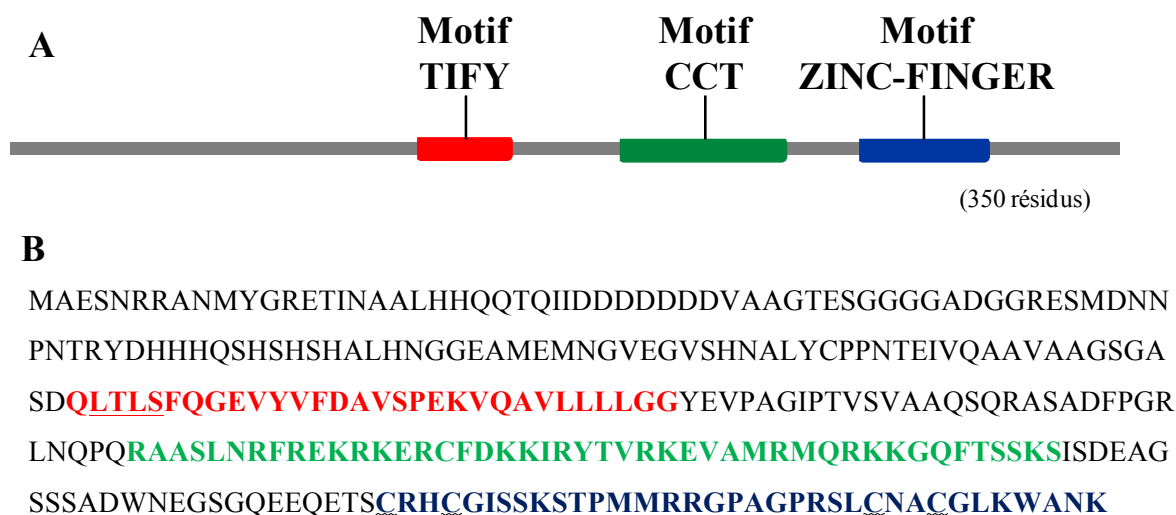
La séquence protéique déduite de l'ORF de NsZnf comporte 350 acides aminés (Figure 36A et 36B).



La comparaison de séquences sur NCBI et TAIR a montré que la plus forte homologie était observée avec les séquences des protéines ZIM (Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem) en particulier ZIM-LIKE 1. Ces protéine possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type GATA-zincFinger. La présence de ce domaine GATA-zincFinger au sein de la protéine NsZnf permet en effet de la classer dans la famille des protéines GATA-zinc finger (Shikata *et al.*, 2003). Cependant d'autres similarités ont été observées avec les protéines TIFY2A et ZIM-LIKE 2 ce dernier étant considéré comme facteur de transcription chez *Arabidopsis thaliana* (Vanholme *et al.*, 2007). Une ORF similaire a été détectée également chez *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa* et *Ricinus communis* mais aucune protéine similaire n'est présente chez les animaux (Figures 37 et 38) Ce constat suggère que nous sommes en présence d'une protéine spécifique des plantes (Shikita *et al.*, 2003).

### **B. Motifs protéiques de la protéine NsZnf**

Les signatures qui sont répertoriées dans les bases de données, sont des motifs protéiques conservés auxquels est attribuée une fonction. L'analyse bioinformatique prédictive de NsZnf suggère la présence de 3 motifs protéiques dont un doigt de zinc (figure 36A et 36B).



**Figure 36 : Signatures et structure de la séquence protéique de NsZnf.**

**A et B :** motifs protéiques conservés dans la séquence. En A sont représentés les domaines sur la séquence primaire issue de la traduction de l'ADNc. En B, position des motifs conservés dans la séquence peptidique de NsTIFY. Trois motifs protéiques sont présents dans la séquence : un motif TIFY (rouge) suivi d'un motif CCT (bleu) et un domaine zinc-finger (vert) en C terminal. ~~CRHC~~...~~CNAC~~ : motif zinc finger de type C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C. ~~LTLS~~ représente une variation du motif TIFY (Shikita *et al.*, 2003 ; Vanholm *et al.*, 2007).

### Domaine GATA-Zinc-Finger

Une recherche de similarité dans les banques de données informatiques (Swiss-Prot, InterProscan, Pfam), nous a permis d'identifier un doigt de zinc C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C dans la séquence de NsZnf. Le domaine en doigt de zinc est présent chez de nombreux facteurs de transcription et assure la liaison à l'ADN. Les doigts de zinc sont constitués par une courte séquence de 25 à 30 acides aminés associant une hélice  $\alpha$  et deux feuillets  $\beta$  pour constituer une structure en doigt coordonnant un atome de Zn<sup>2+</sup>. Shikata *et al*, 2003 ont caractérisé une protéine de type GATA-zinc-Finger chez *Arabidopsis thaliana* possédant également le domaine C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Figure 36A) retrouvé par la suite dans d'autres protéines chez d'autres espèces végétales (Vanhholm *et al.*, 2007).

L'alignement des séquences avec les protéines d'autres espèces végétales (Figure 37) a montré que le domaine GATA-Zinc-Finger de NsZnf est conservé à 95%. Ce domaine est enregistré sous le numéro d'accès PF00320 dans les bases de données Pfam et le numéro IPR000679 dans les bases de données InterPro-scan. En conclusion, les données bioinformatiques suggèrent que NsZnf appartient à la famille des GATA-type Zinc-Finger de type C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Niishi *et al.*, 2000, Shikata *et al.*, 2003). Le doigt de zinc de la protéine NsZnf est associé à un domaine CCT et un domaine TIFY.

### Domaine CCT (CONSTANT, CO-like, TOC1)

Associé à ce doigt de zinc, la protéine NsZnf possède un domaine basique CCT référencé dans la base de données Pfam sous le numéro d'accès PF06203 et dans la base de données InterPro-scan sous le numéro IPR010402. Ce domaine CCT est un module de 40 résidus retrouvés à l'extrémité C-terminal de NsZnf. Il peut être associé à d'autres domaines conservés comme le domaine TIFY, le domaine RRD (Response Regulatory Domaine). Ce motif riche en Lysine et Arginine pourrait représenter une séquence de localisation nucléaire (Strayer *et al.*, 2000 ; Panda *et al.*, 2000). Ce domaine présent dans les séquences alignées est conservé à plus de 90% entre les espèces (Figure 37). Strayer *et al*, 2000 suggère que ce domaine serait impliqué dans la localisation intracellulaire.

### Domaine TIFY

Le troisième domaine identifié chez NsZnf correspond au domaine TIFY. Les protéines portant ce domaine ont été décrites pour la première fois par Nishii *et al* en 2000 et sont caractéristiques des plantes supérieures.

Au sens large, toute protéine possédant ce domaine acide est répertoriée comme protéine TIFY (Vanholme *et al.*, 2007). Ce motif peut être du type TIF[F/Y]XG ou du type TLS[F/Y]XG. Ce motif est référencé dans les bases de données PFam sous le numéro d'accèsion PFO6200 et dans la base de données InterPro-scan sous le numéro PS51320. La fonction de ce domaine est à ce jour inconnue (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Cependant, Chung *et al.*, 2009, suggère que ce motif présent seul dans les protéines JAZ serait impliqué dans les interactions homodimériques ou hétérodimériques de type TIFY/TIFY ou TIFY/ZIM dans la voie de répression des gènes induits par l'acide jasmonique.

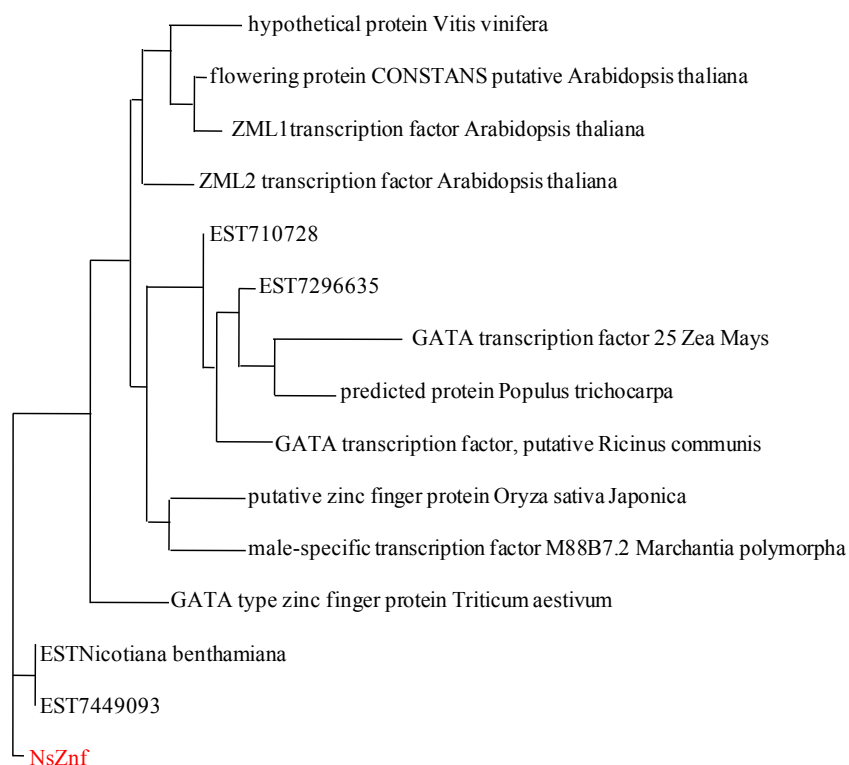
En conclusion, les analyses bioinformatiques réalisées sur la séquence protéique NsZnf suggèrent qu'il s'agit d'une protéine GATA-ZincFinger dans lequel sont retrouvés un domaine CCT et un domaine TIFY.

N. sylvestris	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
V. vinifera	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R. communis	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. trichocarp	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M. polymorpha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O. sativa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Z. mays	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. benthamian	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST710728	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7449093	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7296635	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. sylvestris	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
V. vinifera	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R. communis	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. trichocarp	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M. polymorpha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O. sativa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Z. mays	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. benthamian	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST710728	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7449093	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7296635	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. sylvestris	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
V. vinifera	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R. communis	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. trichocarp	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M. polymorpha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O. sativa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Z. mays	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. benthamian	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST710728	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7449093	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7296635	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. sylvestris	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
V. vinifera	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R. communis	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. trichocarp	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M. polymorpha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. thaliana	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
O. sativa	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Z. mays	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N. benthamian	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST710728	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7449093	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST7296635	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Figure 37 : Alignements de protéines de neuf espèces différentes qui possèdent les trois régions GATA-Zing Finger, CCT et TIFY similaires à celles de NsZnf. Les protéines sont indiquées par le nom de la plante dont elles sont issues. La région en rouge correspond au domaine TIFY, en vert au domaine CCT et en bleu le Zinc-Finger. Les zones non colorées ont une similarité < 90%.

### **C. Analyse phylogénétique de NsZnf**

Pour compléter l'analyse de la protéine NsZnf, nous avons établi un arbre phylogénétique par une méthode de parcimonie en utilisant le logiciel BioEdit. Cette analyse a été faite sur les mêmes séquences protéiques utilisées pour la comparaison de séquences en Figure 37. Ainsi, nous avons pu observer la proximité de NsZnf par rapport aux autres protéines issues d'espèces différentes (Figure 38).



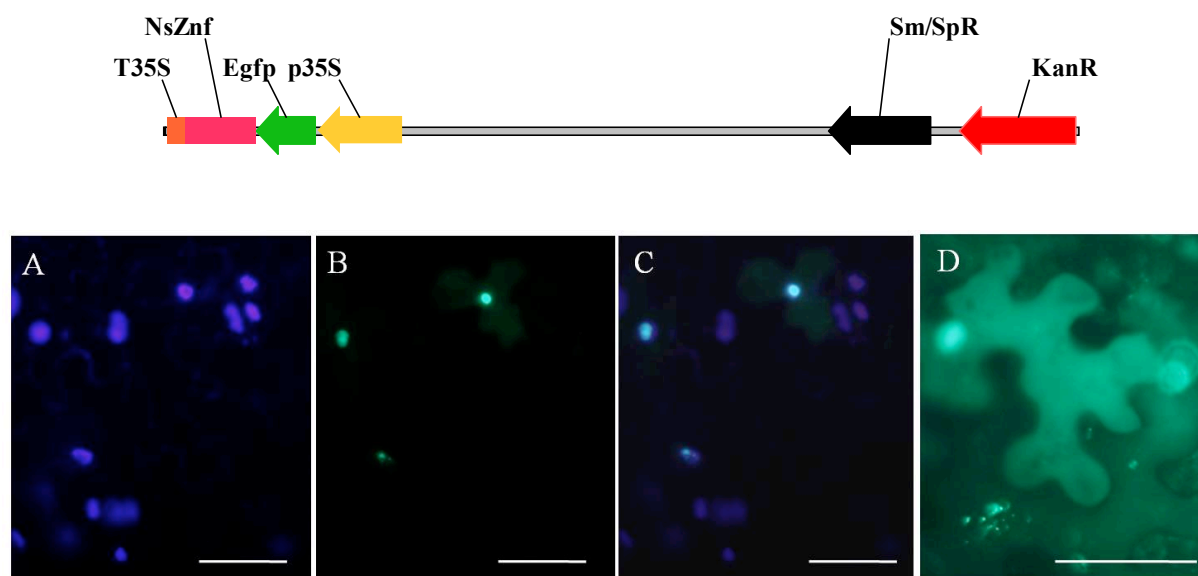
**Figure 38 : Arbre phylogénétique de parcimonie des séquences protéiques portant les domaines GATA-ZincFinger, CCT et TIFY chez 9 espèces végétales. L'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel bioEdit, à partir de l'alignement des séquences protéiques possédant les trois domaines conservés (Figure 37). La similarité de deux séquences est inversement proportionnelle à la longueur des branches qui séparent les deux protéines. EST 710728, EST449093, EST7296635 et ESTNicotiana benthamiana sont des ESTs de solanacées (banque EST de Librophyt).**

Nous constatons que NsZnf est plus proche des EST de tabac que des autres espèces. De même, les protéines issues d'*A.thaliana* sont regroupées entre elles. NsZnf semble être le premier membre identifié d'une famille TIFY chez *Nicotiana*.

### III. Analyse fonctionnelle de la protéine NsZnf

#### A. Localisation intracellulaire de la protéine fusion GFP::NsZnf

Le rôle potentiel de NsZnf comme facteur de transcription implique une localisation nucléaire de la protéine. Afin de déterminer cette localisation intracellulaire, nous avons réalisé une fusion traductionnelle de la protéine avec la GFP et testé sa localisation dans des cellules de tabac par expression transitoire par agroinfiltration chez *N. benthamiana* (Figure 39).



**Figure 39 : Localisation intra-cellulaire de la fusion GFP::NsZnf, dans les cellules épidermiques de *N.benthamiana*.** L'ADNc de NsZnf a été fusionné en N-terminal à la séquence codant pour la GFP. La construction a été transformée de façon transitoire dans les feuilles de *N.benthamiana* par infiltration *via Agrobacterium*. **A** : coloration DAPI des noyaux des cellules, **B** : Localisation de la fusion GFP::NsZnf : **C** : Superposition des images A et B. **D** : Localisation de la protéine 35S::GFP seule. Les observations ont été effectuées au microscope. Barre d'échelles : 100µm.

Les cellules transformées par la fusion GFP::NsZnf montre un signal qui co-localise avec le noyau (Figure 39B). La superposition des spots GFP::NsZnf avec les zones de faible fluorescence DAPI suggère que la localisation se limite à une partie du noyau, certainement le nucléole (Figure 39C). Cette localisation intranucléaire n'est pas incompatible avec un rôle de facteur de transcription et se produit souvent dans le cas de surexpression d'un transgène. Ce type d'adressage a notamment déjà été observé pour des facteurs de transcription, comme par exemple le facteur Nopp140 de la levure (Miau *et al.*, 1997).

Chez les animaux, la protéine ARF stabilise le facteur p53 en séquestrant la protéine mdm2 dans les nucléoles (Weber *et al.*, 1999). Le signal du contrôle 35S::GFP est observé dans l'ensemble de la cellule épidermique sans aucune localisation spécifique (Figure 39D).

**B. Essais de mise en évidence *in vitro* d'une interaction directe entre l'ADN cible 400c et le facteur NsZnf**

Dans le test simple hybride, la protéine NsZnf conduit une activation du gène rapporteur uniquement en présence de la séquence 400c dans la levure. Les données bioinformatiques suggèrent que NsZnf appartient à la famille des facteurs de transcription GATA-type Zinc-Finger (Niishi *et al.*, 2000).

De plus, sa localisation nucléaire suggère que NsZnf pourrait être un facteur régulateur de la transcription. Jusqu'à présent aucune expérience n'a permis de montrer une interaction directe entre les protéines GATA-ZincFinger C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C et la séquence (A/T)GATA(A/G) (Merika *et al.*, 1993). Dans le but de mettre en évidence l'interaction directe entre NsZnf et la séquence 400c, nous avons dans un premier temps surproduit puis purifiée la protéine NsZnf. La protéine a ensuite été utilisée pour différents essais de retard sur gel (EMSA :Electrophoretic Mobility Shift Assay) en présence de deux sous-fragments du 400c. En effet en raison de la limite de taille des fragments d'ADN utilisables en gel retard, ce fragment a été divisé en deux portions appelées 3c et 2c (Figure 43).

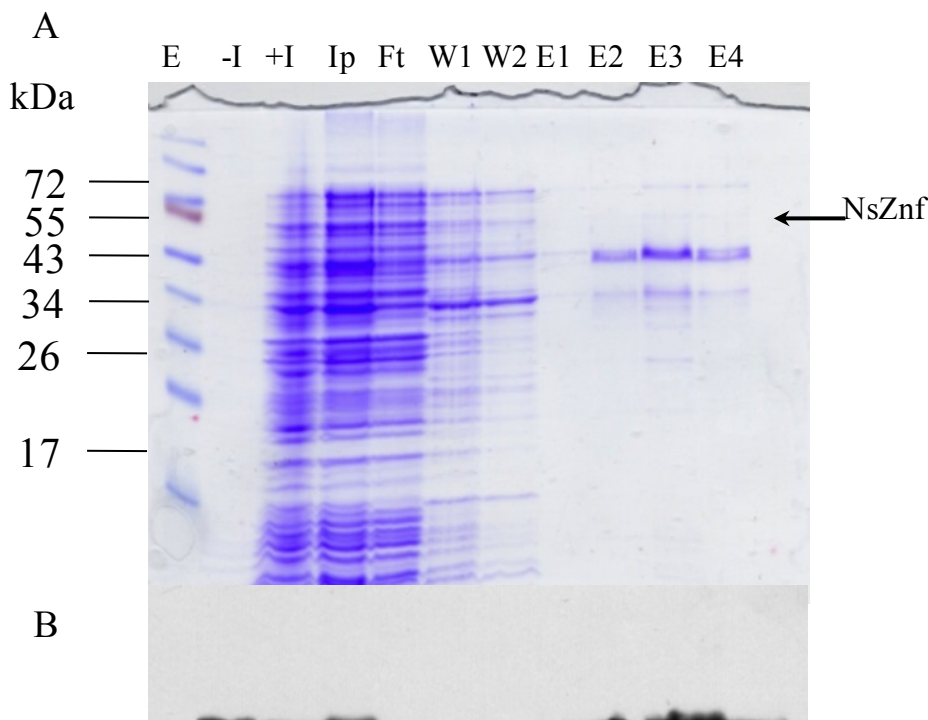
**1. Surexpression de la protéine NsZnf recombinante**

L'ADNc de NsZnf a été cloné dans le vecteur de surexpression procaryotique pDEST17 (Annexe). Ce vecteur permet une induction de protéines par l'arabinose. Un étiquetage de la protéine par 6 histidines (His-Tag) est présent en N-terminal. Il facilite la purification et la détection de la protéine recombinante grâce à un anticorps anti His-Tag. La protéine a été surproduite dans deux conditions différentes : en conditions dénaturantes (en présence d'urée) et en conditions natives. Les deux types de protéines recombinantes ont ensuite été utilisées pour les essais de retard sur gel.



**a) Purification en conditions dénaturantes**

Dans ces conditions, la surexpression de la protéine a été faite à 37°C et induite par 0,2% d'arabinose.



**Figure 40 : Purification sur résine Ni-NTA agarose en conditions dénaturantes (500 mM d'imidazol, 8M Urée) de la protéine recombinante polyHis-NsTIFY. A : Coloration au bleu de Coomassie des différentes étapes de la purification sur colonne Ni-NTA. B : Immunodétection de la protéine recombinante par l'anticorps antiHis-Tag. I : Induction, Ip : Input, W1/2 : lavages, E1/2/3 : différentes éluions à 500 mM d'Imidazol.**

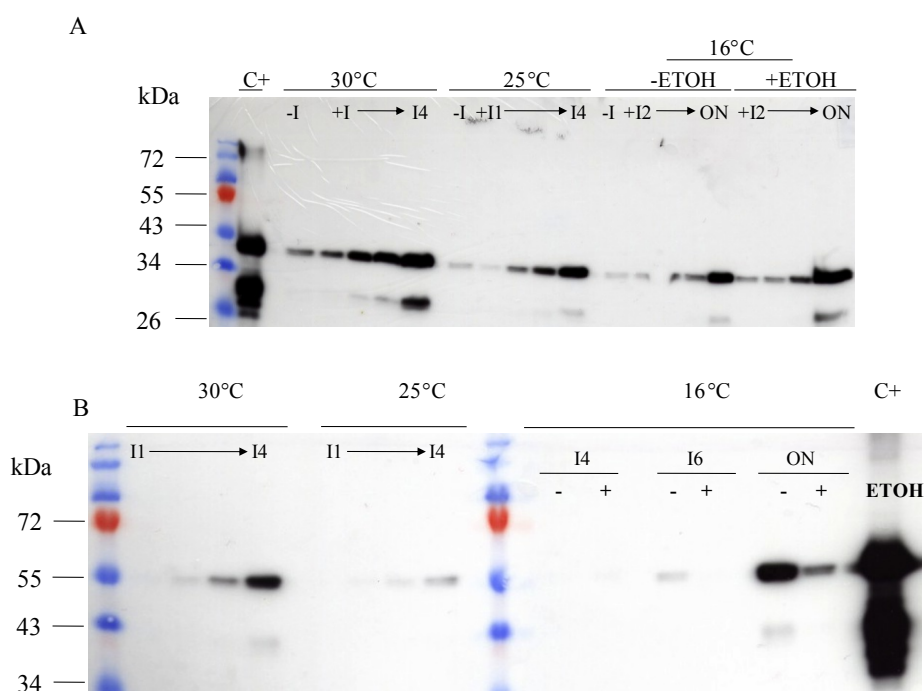
Dans les conditions dénaturantes, la protéine recombinante élue est visible sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Figure 40A), le westernblot confirmant l'identité de la protéine élue (figure 40B). La protéine surproduite sera utilisée pour mettre en évidence l'interaction éventuelle avec les fragments 2c et 3c (constituant le fragment 400c) par retard sur gel.

**b) Surexpression en conditions natives**

La protéine recombinante a été surexprimée dans la souche BL21 2h après une induction avec 0,2% d'arabinose que ce soit à 16°C, 25 ou 30°C (Figure 20). De plus l'influence de la présence d'éthanol dans le milieu de culture a été testée (Rotein *et al.*, 2009). Des aliquots ont été prélevés à différents temps après induction.



Ces expériences montrent qu'une induction de 4h à 30°C ou à 25°C ou sur la nuit à 16°C permet la synthèse de la protéine NsZnf (Figure 41A). La présence d'éthanol n'apporte pas d'amélioration. Les bactéries de chaque fraction ont été lysées par sonication. Une fois centrifugées, la fraction soluble (surnageant) a été déposée sur gel pour vérifier la présence ou non de la protéine (figure 41B).



**Figure 41 : Surexpression de la protéine recombinante et détection par l'anticorps antiHis-tag. A : Les températures 30°C, 25°C et 16°C sont testées afin de déterminer les conditions optimales de surexpression de la protéine. Pour 16°C, la surexpression a été testée en présence et en absence d'éthanol 0,01%. B : Conditions de solubilité de la protéine recombinante. I1, I2, I4 et I6 : 1h, 2h, 4h, 6h de culture après induction ; ON : Over Night. Seule la fraction soluble a été utilisée dans le gel B.**

Deux conditions de solubilités optimales de la protéine ont été ainsi déterminées : à partir de 4h de culture à 30°C après induction ou 16°C pendant la nuit (figure 41A et 41B). Nous avons choisi de surexprimer la protéine à 30°C pendant 4h. Après avoir défini les conditions de production, nous avons purifié la protéine sur colonne Ni-NTA.

Dans les conditions natives, la protéine recombinante est éluée dès la deuxième fraction d'élution. Bien qu'elle soit peu visible sur le gel de Comassie (Figure 42A), le westernblot confirme que notre protéine a bien été purifiée (Figure 42B). La protéine surproduite sera utilisée pour mettre en évidence l'interaction éventuelle avec le fragment 400c par EMSA.

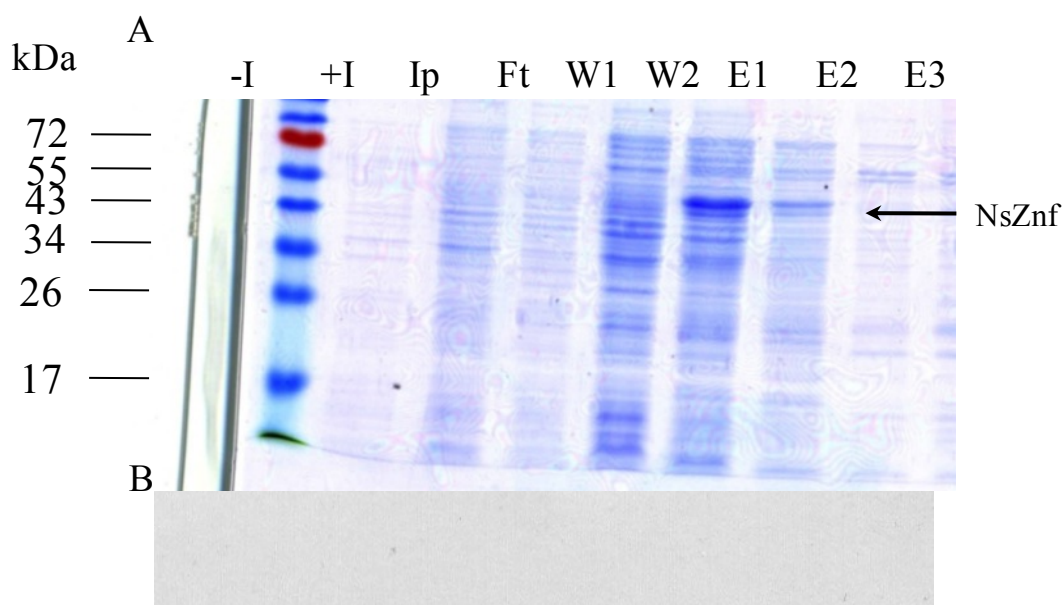


Figure 42 : Purification sur résine Ni-NTA agarose en conditions natives (250 mM d'imidazol) de la protéine recombinante polyHis-NsZnf. A : Coloration au bleu de Coomassie des différentes étapes de la purification sur colonne Ni-NTA. B : Immunodétection de la protéine recombinante par l'anticorps antiHis-Tag. I : Induction, Ip : Input, W1/2 : lavages, E1/2/3 : différentes éluions à 250 mM.

## 2. Détermination de l'interaction entre NsZnf et le promoteur de *NsTPSO2a*

La protéine NsZnf sous forme dénaturée ou native a été mise en présence deux sondes ADN 2c (160 pb) et 3c (200pb) qui constituent le fragment 400c (Figure 43). Ces sondes sont marquées à la biotine aux extrémités 5'.

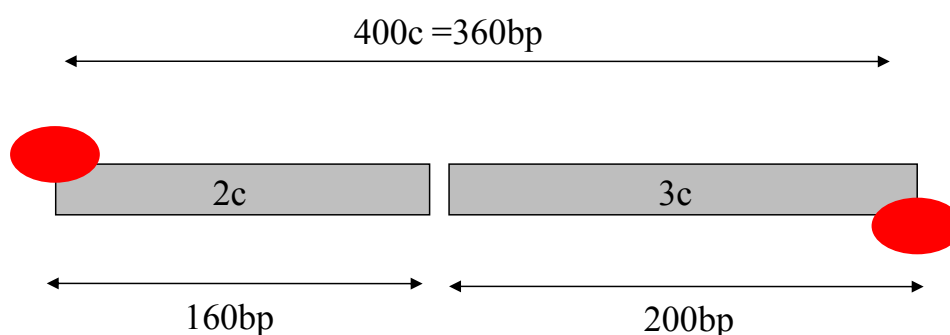
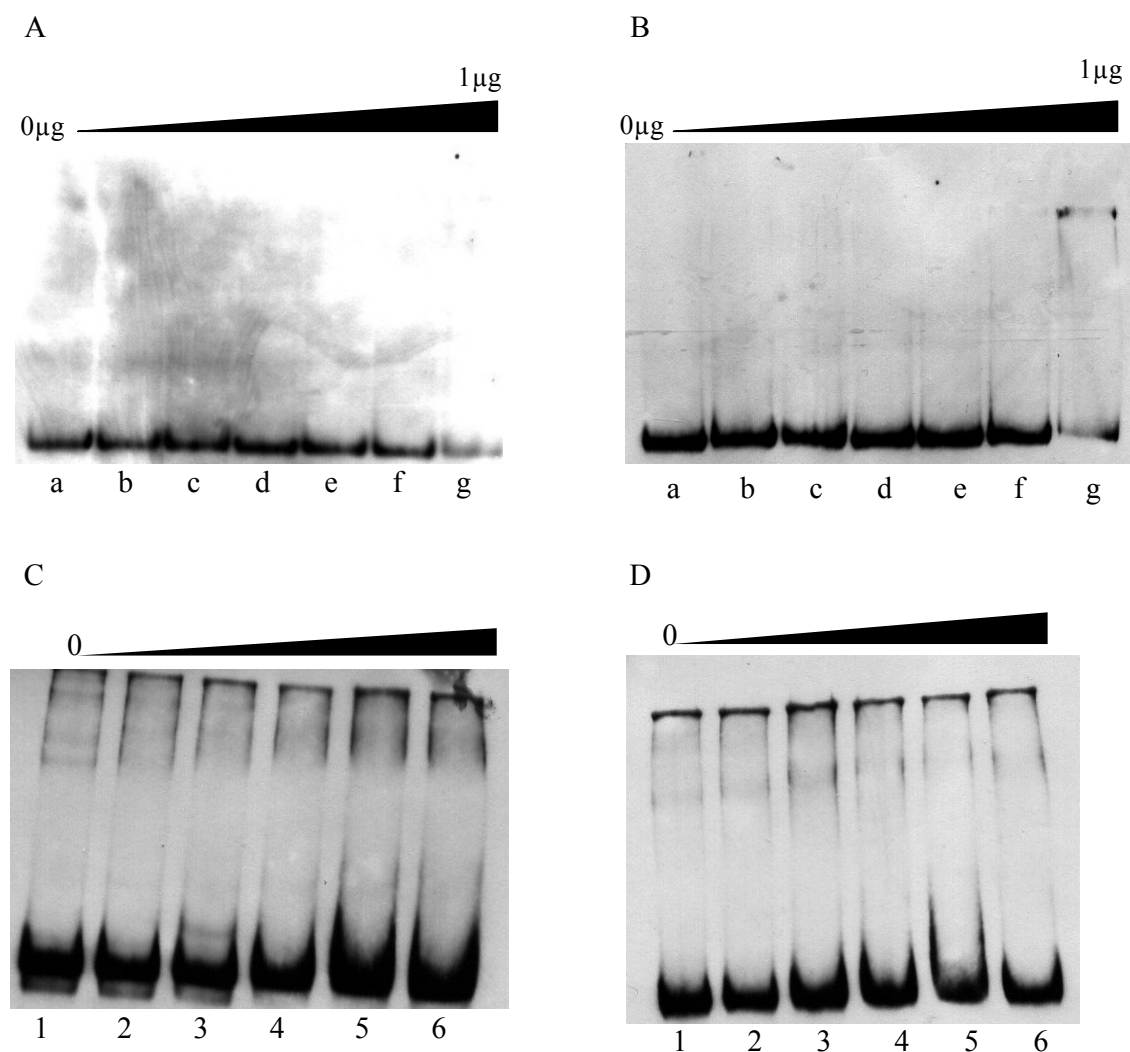


Figure 43 : Schéma des sondes 2c et 3c biotinylées à l'extrémité 5'.

Ces sondes constituant le fragment 400c sont utilisées pour les essais de gel retard avec la protéine NsZnf.

Ces sondes sont mises en présence d'un volume croissant de protéine NsZnf recombinante dénaturée (Figure 44A et 44B) et native (44C et 44D).



**Figure 44 : Retard sur gel entre la protéine NsZnf et les sondes 2cb et 3cb.**

**A : Autoradiographie du retard sur gel réalisé avec la protéine NsZnf dénaturée et la sonde 2cb.**

**B : Autoradiographie du retard sur gel réalisé avec la protéine NsZnf dénaturée et la sonde 3cb.**

**C : Autoradiographie du retard sur gel réalisé avec la protéine NsZnf native et la sonde 2cb**

**D : Autoradiographie du retard sur gel réalisé avec la protéine NsZnf native et la sonde 3cb.**

**La séquence de chacune des sondes de 160 pb et 200 pb est figurée en annexe.**

**Le marquage froid des sondes a été réalisé par PCR.**

Dans les conditions dénaturantes Les autoradiographies présentées en figure 44A et 44B correspondent aux tentatives de retard sur gel réalisées avec la protéine NsZnf dénaturée et la sonde 2c et 3c respectivement. En absence de protéines, les sondes marquées à la biotine 2c et 3c ne sont pas retardées (Figure 44A puits a et 44B puits a).

L'ajout de protéine recombinante en concentration croissante n'entraîne pas l'apparition de retard de la sonde (Figure 44A puits b à g et 44B puits b à g). Les mêmes essais ont été réalisés avec la protéine renaturée par dialyse mais aucun retard n'a été pour autant observé (résultat non-montré).

Dans les conditions natives Les autoradiographies présentées en figure 44C et 44D correspondent aux tentatives de retard sur gel réalisées avec la protéine NsZnf native et les sondes 2c et 3c respectivement. En absence de protéines, la sonde marquée à la biotine 2c n'est pas retardée (Figure 44 C puits 1 et 44 D puits 1). L'ajout de protéine en concentration croissante n'entraîne pas l'apparition de retard de la sonde (Figure 44 C puits 2 à 6 et 44D puits 2 à 6).

Enfin, nous avons procédé à une dernière expérience mettant en présence la protéine NsZnf native et la séquence 400c marquée entière mais la migration du fragment marquée étant faible nous n'avons pas pu voir de retard entre la sonde seule et la sonde en présence de NsZnf.

En conclusion, il nous a été impossible dans nos conditions expérimentales de mettre en évidence une interaction directe entre la protéine NsZnf et le P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>.

### ***IV. Conclusion***

Le crible simple hybride nous a permis d'isoler la protéine NsZnf capable d'interagir avec le fragment 400c dans la levure. Les caractéristiques bioinformatiques, l'analyse des séquences peptidiques et l'analyse phylogénétique suggèrent que cette protéine aurait un rôle de facteur de transcription notamment par la présence du doigt de zinc et la localisation nucléaire que nous avons démontrés. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction directe entre cette protéine et le fragment 400c *in vitro*.

## Discussion

L'identification et l'analyse fonctionnelle des promoteurs trichomes spécifiques (Wagner *et al.*, 2001 ; Shangguan *et al.*, 2008) est un préalable à indispensable pour la bioingénierie et la production de molécules à fortes valeurs ajoutées. Le premier objectif de notre travail de thèse était d'identifier les éléments cis régulateur de  $P_{1.1N_sTPSO2a}$  dans le but d'améliorer le procédé de production des molécules d'intérêt développé par Librophyt. Le deuxième objectif consistait à isoler un facteur de trans régulant ce ou ces éléments cis. A plus long terme l'utilisation couplée du facteur trans et de l'élément cis régulateur permettrait d'améliorer le rendement de production des molécules à forte valeur ajoutée.

### ***I. Les éléments cis régulateurs dans le promoteur $P_{1.1N_sTPSO2a}$***

L'étude bioinformatique, nous a permis de prédire l'existence de six éléments *cis* potentiels sur  $P_{1.1N_sTPSO2a}$ . Parmi eux, 3 sont communs avec d'autres promoteurs trichomes spécifiques régulant les gènes de la Farnezyl phosphate synthase de *N.sylvestris* (Sallaud *et al.*, 2009), de la Sesquiterpène synthase de *Lycopersicon hirsutum*, de la copalol diphosphate synthase de *N.tabacum*, l'abienol synthase de *N.tabacum*.

L'approche préliminaire par biolistique semble être efficace pour étudier l'activité spécifique de promoteur organe-spécifique de plante (Agius *et al.*, 2005). Cependant cette approche n'avait jamais été appliquée directement sur des trichomes. Dans notre étude, l'utilisation de la biolistique s'est avérée délicate dans l'analyse fonctionnelle de  $P_{1.1N_sTPSO2a}$ . Cette première approche rapide nous cependant a permis, en corrélation avec l'analyse bioinformatique, de retenir 7 délétions sur les 9 réalisées.

L'analyse fonctionnelle en utilisant l'approche transgénique dans un fond génétique *N.sylvestris* (lignée source), semble être mieux adapté pour répondre à la question de l'expression spécifique dans les cellules sécrétrices des TGSs de *N.sylvestris*. En effet, nous n'avons pas observé de spots épidermiques lors de l'expression du  $P_{1.1N_sTPSO2a}$ . L'analyse fonctionnelle du  $P_{N_sTPSO2a}$  a été entreprise initialement avec deux fragments de 1.7kb et 1,1 kb. Nous avons constaté que la forme courte (1,1 kb) était suffisante pour diriger une expression spécifique dans les trichomes glandulaires de *N.sylvestris*. Elle doit donc contenir l'ensemble des éléments régulateurs. Dans notre analyse fonctionnelle du  $P_{1.1N_sTPSO2a}$  nous avons donc construit des promoteurs partiellement délétés placés en amont du gène rapporteur *GUS* codant pour l'enzyme Glucoronidase.

Des analyses par la GFP étaient prévues mais elles étaient impossible à réaliser du fait de la fluorescence naturelle des trichomes. Des lignées transgéniques des 7 promoteurs délétés ont été obtenues et analysées. Nous avons analysé la coloration GUS des têtes des trichomes glandulaires pour identifier les régions régulatrices pour chaque construction. Nous avons construit deux contrôles importants : les fusions  $\Delta 5s::GUS$  et  $\Delta 1c::GUS$ . La première, est caractérisée par l'absence totale de séquence promotrice conférant une absence de coloration GUS dans les plantes transgéniques. Ceci confirme qu'il n'existe pas d'expression résiduelle due à l'activité du fragment  $\Omega$  ni aucune interférence du vecteur dans l'expression du transgène. Le fragment 1c couvre la TATA box, 35 pb en amont du site d'initiation de la transcription (+1) déterminée par Librophyt par 5'-RACE PCR. La fusion  $\Delta 1c::GUS$  ne conduit à aucune coloration des plantules ce qui confirme l'absence d'autres sites majeurs d'initiation de la transcription. L'ensemble des délétions séquentielles et contigües indiquent que les fragments 4c et 400c portent des éléments cis régulateurs du promoteur  $P_{1.1NsTPSO2a}$ .

### ***A. La région 4c contient un activateur transcriptionnel indispensable à l'expression de NsTPSO2***

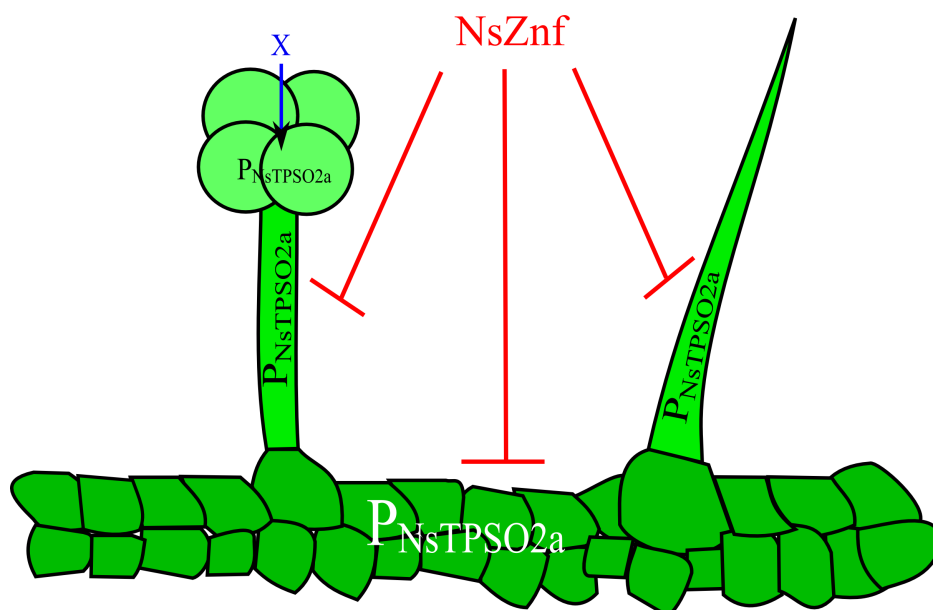
La fusion  $\Delta 4c::GUS$  entraîne l'absence de coloration GUS dans les TGSs comme dans les autres types cellulaires, suggérant l'existence d'une séquence activatrice dans cette région du promoteur. Ceci a été confirmé par l'observation d'une restauration de l'expression dans les TGSs des plantes transformées par la fusion  $4c::P_{35Smin}::GUS$ . Cependant, cette coloration n'est pas strictement limitée aux cellules de têtes des TGSs. En effet, une coloration a été observée dans le pied des trichomes et dans les cellules épidermiques. Il est donc probable que le fragment 4c soit reconnu par des facteurs trans-activateurs qui sont responsables de son expression dans les TGSs et que d'autres éléments répresseurs présents dans le reste de promoteur permettent de restreindre d'avantage l'expression aux cellules de têtes des TGSs. De tels éléments cis-répresseurs pourraient être présents sur le fragment 400c donc la délétion entraîne une coloration ectopique des cellules épidermiques.

### ***B. La région 400c contient un élément répresseur dans les cellules non-trichome***

La région 400c de 360 pb comprend les sous-régions 3c (200pb) et 2c (160pb). La délétion de la région 2c a été récalcitrante au clonage, et n'a pas pu être testée par transgénèse. Par contre, le profil d'expression de  $\Delta 3c::GUS$  est comparable à celui de  $P_{1.1NsTPSO2a}$ .

Aussi c'est très probablement l'absence de la région complémentaire 2c qui est responsable du profil d'expression caractéristique de  $\Delta 400c$  (coloration des pieds et des cellules épidermiques). Nous avons effectué la transgénèse de  $400c::P_{35Smin}::GUS$  dans les LS de *N.sylvestris* mais nous n'observons aucune coloration ni dans les TGSs ni dans les cellules épidermiques. Cette évidence négative nous conduit à penser que le fragment 400c serait reconnu par un ou plusieurs répresseurs et participerait à limiter l'expression aux têtes glandulaires (Figure 45). Il résulte de cette étude, que la spécificité d'expression du  $P_{1.1NsTPSO2a}$  est contrôlée par au moins deux éléments, un activateur contenu dans la région 4c et un répresseur pour les cellules non-trichomes localisé dans le 400c, probablement dans la région proximale 2c. Concernant les racines, nous avons observé une coloration bleue au niveau de certaines cellules de l'épiderme de la racine principale ainsi qu'à son extrémité pour la fusion  $\Delta 400c::GUS$ . Cette observation suggère que cette région réprime également l'expression du gène *TPSO2a* dans la racine et qu'un facteur de transcription spécifique reconnaissant cette région 400c existe dans la racine.

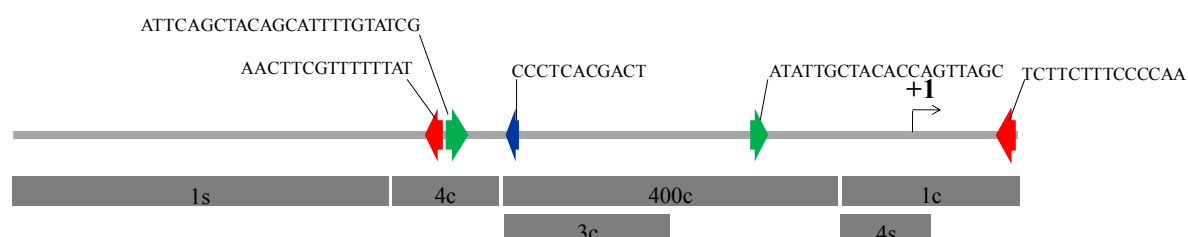
Avec l'objectif à plus long terme d'exprimer spécifiquement une protéine d'intérêt dans les TGSs de *N.sylvestris*, les fragments indispensables à inclure dans un promoteur chimérique sont le 4c (110pb) et le 400c (360pb). Ces fragments pourraient être utilisés sous forme simple ou multimérisée en fusion avec un promoteur minimum, ou mieux avec un promoteur fonctionnant dans le trichome. Le promoteur chimérique ainsi obtenu serait un outil pour l'expression spécifique dans les trichomes glandulaires.



**Figure 45 : Modèle de régulation du  $P_{1.1NsTPSO2a}$  dans le trichome et dans les cellules de l'épiderme de *N.sylvestris*. X représente un facteur de transcription activateur reconnaissant le promoteur.**

## II. Eléments cis régulateurs et facteurs de transcriptions

En alignant directement les 3 motifs identifiés *in silico* avec les fragments délétés du P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>, nous constatons que des motifs consensus sont présents dans les régions 1c, 4c, 3c, 400c (Figure 46).



**Figure 46 : Alignement des motifs prédits par MEME et les fragments délétés du P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>**

Les motifs 1,5 et 6 sont respectivement représentés par une flèche rouge, bleue et verte sur la séquence. La position de chaque motif est déterminée à partir de l'extrémité 3' du promoteur.

Nous avons cherché à identifier de façon prédictive les facteurs reconnaissant ces motifs en utilisant le logiciel PLACE.

Dans le motif 1 (région 1c et 4c), la séquence nucléotidique AAAG retrouvée pourrait être reconnue par les facteurs de transcriptions DNA-BINDING WITH ONE FINGER (DOF) (consensus du site de reconnaissance AAAG ou CTTT). Ces protéines ont la particularité de posséder un seul doigt de zinc de type CX<sub>2</sub>CX<sub>21</sub>CX<sub>2</sub>C.

Ces protéines semblent être impliquées dans différents processus spécifiques aux plantes comme la réponse au stress (Kang *et al.*, 2003), la réponse à la lumière (Papi *et al.*, 2002), la réponse aux hormones gibbérellines (Mena *et al.*, 2002). Les gènes cibles de ces protéines sont entre autres des gènes codant des enzymes comme la Phospho-Enol Pyruvate Carboxylase (étape du Tricarboxylic Acid Cycle) (Yanagisawa, 2004).

Sur le motif 5, PLACE a mis en évidence deux éléments cis régulateurs (11pb) (Figure 46). La première séquence régulatrice GTGA est présente dans le gène g10 impliqué dans la maturation du pollen chez *N.tabacum* (Rogers *et al.*, 2001). Le deuxième élément cis-régulateur (G/T)CACG(T/A) fixerait la partie C-terminale des facteurs RHEs (Root hair-specific cis-Elements). D'après Kim *et al.* (2006), ces facteurs spécifiques des poils absorbant sont actifs chez les angiospermes et les promoteurs possédant cet élément ne sont actifs que dans les poils absorbants. L'analyse du motif 6 révèle la possible fixation de protéines impliquées dans l'activation de la voie de l'acide abscissique.



En effet, le facteur AtMYC2 reconnaît le motif C/TAACG/TG (Abe *et al.*, 2003) et la séquence ACACNNG (bases 9 à 15) serait reconnue par les facteurs de transcription de type bZIP PBF 1 impliqué dans l'expression du gène *Dc3* de carotte dans la réponse à l'ABA (Kim *et al.*, 1997).

Aucunes de ces protéines ou de proches homologues n'ont été isolées lors de nos cribles simples hybrides. Aussi, nous n'avons pas établi de lien réel entre l'analyse bioinformatique de nos promoteurs spécifiques des trichomes et la recherche de facteurs transcriptionnels.

L'approche expérimentale par crible simple hybride dans la levure ne nous a pas permis d'identifier de facteur potentiel reconnaissant le fragment 4c. L'insertion de ce fragment en amont du gène de sélection *HIS3* entraîne malheureusement une forte croissance des levures sur milieu sélectif, probablement du fait d'une activation non-spécifique dans les cellules de levure. Du fait de l'impossibilité de réduire cette croissance par l'apport de 3-AT, aucun facteur trans n'a pu être isolé pour ce fragment.

### ***III. Spécificité d'interaction entre NsZnf et 400c***

Le crible simple hybride a permis d'identifier un ADNc codant pour un facteur de transcription potentiel (appelé NsZnf) capable d'induire la croissance des levures en présence de la séquence 400c spécifiquement et de façon reproductible. Ce résultat suggère que ce facteur de transcription potentiel interagit avec la séquence 400c. L'absence d'une telle interaction *in vitro* avec la protéine NsZnf recombinante produite chez *E. coli* ne permet pas de confirmer à ce jour cette interaction. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat. Le système de production bactérien n'est pas favorable dans le cas où une modification post-traductionnelle est nécessaire à la fonctionnalité du facteur.

Par ailleurs, nous pouvons envisager la nécessité d'un cofacteur présent dans la levure mais qui n'existe pas dans le système bactérien. Cependant l'hypothèse d'un artéfact lié au système levure ne peut pas être exclue dans la mesure où ce clone n'a été détecté qu'une fois sur les douze clones sélectionnés. Ainsi nous ne pouvons pas exclure l'activation par le facteur NsZnf d'un gène endogène de levure qui à son tour pourrait lier le fragment 400c et activer spécifiquement la transcription du gène rapporteur. La mise en évidence de l'interaction entre 400c et NsZnf, peut être envisagée par une surexpression dans la levure, le baculovirus.

Le test EMSA pourrait être refait avec une protéine recombinante correctement modifiée au niveau post-traductionnel, et purifiée dans les conditions natives. Pour déterminer l'interaction avec le fragment 2c ou 3c *in planta*, une expérience de chromatine immunoprécipitation pourra être tentée entre la protéine flanquée d'un étiquetage (HA ou myc) et l'un ou l'autre des fragments 2c et 3c de la région du 400c, voire avec le fragment 400c en entier.

### ***IV. NsZnf un facteur de transcription de type GATA-zinc Finger ?***

Comme indiqué précédemment, la protéine NsZnf a été isolée d'un crible simple de la levure en utilisant le fragment 400c entier. Cette protéine possède dans sa séquence peptidique un doigt de zinc ainsi qu'un domaine CCT et un domaine TIFY (anciennement ZIM). Les protéines à doigt de zinc forment un très grand groupe et sont répertoriées en différentes familles et sous-familles en fonction du nombre et du type de motif doigt de zinc qu'elles portent. Le domaine CX<sub>2</sub>CX<sub>20</sub>CX<sub>2</sub>C de NsZnf fait partie de la famille des doigt de zinc de type IV, sous-famille GATA-III (Reyes *et al.*, 2004). La sous-famille GATA doit son nom à la séquence cible ((A/T)GATA(A/G)) reconnue par les membres fondateurs (Teakle *et al.*, 2000). D'après Nishii *et al.* ; 2000, la structure CX<sub>2</sub>CX<sub>20</sub>CX<sub>2</sub>C permet de prédire qu'il s'agit bien d'un doigt de zinc et sa structure primaire serait similaire au doigt de zinc responsable de la reconnaissance de l'ADN des facteurs GATA animaux. Dans le règne végétal, d'autres facteurs de transcription comme les DOFs possèdent un seul doigt de zinc (Yanagisawa *et al.*, 1996) et sont capables de reconnaître le motif GATA sur la séquence cible (Yanagisawa *et al.*, 1997). De même, les protéines ZIM (Zinc-Finger protein expressed in Inflorescence Meristem = protéines TIFY) qui sont proches de NsZnf peuvent posséder un doigt de zinc de type CX<sub>2</sub>CX<sub>20</sub>CX<sub>2</sub>C et sont également répertoriées en tant de GATA transcription factors (Shikata *et al.*, 2004 ; Manfield *et al.*, 2007). Ainsi NsZnf est potentiellement capable de reconnaître spécifiquement une séquence cible d'ADN de type GATA. Les protéines de la sous-famille GATA-III possèdent également comme NsZnf un domaine CCT. Ce domaine serait impliqué dans la localisation nucléaire des protéines (Robson *et al.*, 2001) et/ou dans l'interaction protéine/protéine (Kurup *et al.*, 2000). Les expériences de localisation intracellulaire par fusion avec le gène rapporteur GFP nous ont permis de confirmer un adressage nucléaire de NsZnf. Cependant dans certains cas, nous avons observé une sous-localisation dans le nucléole, siège de la synthèse des ribosomes.

Cette sous-localisation pourrait être un artéfact du à l'utilisation d'un promoteur fort comme le 35S. Cependant, si cette sous-localisation a une signification biologique, cela n'est pas incompatible avec une activité transcriptionnelle de la protéine NsZnf.

En effet, il est désormais admis que des facteurs de transcriptions peuvent être adressés vers les nucléoles. Ainsi, dans les cellules animales, la protéine ARF stabilise le facteur p53 en séquestrant la protéine mdm2 dans les nucléoles (Weber *et al.*, 1999).

Par les alignements des séquences peptidiques, nous avons montré que NsZnf possède un doigt de zinc, un domaine CCT et un domaine TIFY.

Aussi NsZnf appartiendrait à la sous-classe des protéines GATA de type III (Manfield *et al.*, 2007) et s'apparenterait aux protéines TIFY répertoriées dans la base de données InterProscan sous le numéro PS51320 (pour revue : Vanholme *et al.*, 2007). Actuellement, aucune étude n'a permis de démontrer expérimentalement l'interaction entre une protéine telle que NsZnf et une séquence cible de type (A/T)GATA(G/C). Dans l'analyse de l'arbre phylogénétique que nous avons établi, il apparaît que NsZnf est relativement éloignée des protéines TIFY d'*A.thaliana* ou d'*O.sativa*. En revanche, un groupe apparaît dans l'arbre regroupant 2 des ESTs identifiés par Librophyt chez *Solanum tuberosum*, *N.benthamiana* et *N.sylvestris*, ainsi que NsZnf. Cette observation pourrait suggérer une nouvelle famille spécifique des trichomes de solanacées. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'envisager une analyse plus large regroupant d'autres séquences d'EST spécifiques des cellules sécrétrices par exemple et ce sur plusieurs espèces, lorsque celles-ci seront disponibles.

Notre travail a permis de délimiter deux régions cis régulant l'expression du gène *NsTPSO2* dans les trichomes sécréteurs de *N.sylvestris*, répondant ainsi à notre premier objectif. Par ailleurs, nous avons identifié le facteur possédant un doigt de zinc CX<sub>2</sub>CX<sub>20</sub>CX<sub>2</sub> appelé NsZnF. Ce facteur reconnaît un élément dans la région 400c dans la levure. L'absence d'interaction *in vitro* par retard sur gel, ne nous permet pas d'affirmer que NsZnf est un facteur de transcription ni qu'elle interagit spécifiquement avec 400c. Cependant la construction d'un promoteur chimérique incluant ces régions cis reste toujours possible pour optimiser le procédé de Librophyt dans le trichome sécréteur.

## **Conclusion générale**

Ce travail de thèse était inscrit dans le projet de Librophyt visant à exprimer des molécules d'intérêt *via* les trichomes glandulaires de *N.sylvestris*. Les analyses biochimiques effectuées par Librophyt ont en effet montré que la quantité d'exsudat produite par les lignées NsTax destinées à produire du taxadiène n'est pas suffisante. Aussi l'utilisation d'éléments cis régulateurs conférant la spécificité d'expression dans le trichome en amont du gène d'intérêt pourrait moduler l'expression du transgène et permettre une meilleure production dans les TGS des lignées NsTax.

L'analyse fonctionnelle de la séquence de P<sub>NsTPSO2a</sub> a été envisagée afin d'identifier les éléments cis activateurs ou cis répresseurs pour optimiser la production des molécules à forte valeur ajoutée spécifiquement dans les trichomes de *N.sylvestris*. L'objectif de mes recherches a été d'identifier ces éléments activateurs et/répresseurs responsables de la spécificité d'expression du gène *NsTPSO2a* dans les trichomes. Notre étude devait être complétée par l'identification et la caractérisation de(s) facteurs de transcriptions reconnaissant ces régions cis.

Une première approche de génétique et biologie cellulaire nous a conduits à montrer que le P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> est une séquence promotrice suffisante pour conférer une spécificité d'expression dans les cellules sécrétrices des trichomes glandulaires de *N.sylvestris*. De plus, nous avons identifié deux régions importantes, 4c et 400c, dans l'expression spécifique dans les têtes des trichomes glandulaires.

La région 4c de 110pb contient un élément activateur nécessaire à l'expression dans les cellules sécrétrices du trichome. La délétion de cet élément entraîne une absence totale d'expression du gène rapporteur *GUS*. De façon complémentaire, une restauration de la coloration est observée lorsque le fragment est en amont du gène rapporteur avec une coloration est observée dans les têtes de trichomes glandulaires. Ces données montrent que le fragment 4c est nécessaire et suffisant pour conférer la spécificité au promoteur P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>. Le fragment 400c est indispensable pour restreindre l'expression dans les têtes de trichomes notamment par une répression de la transcription du gène *NsTPSO2a* dans les cellules du pied et les cellules épidermiques. En effet, la délétion de ce fragment se caractérise par une expression du gène rapporteur dans l'épiderme, les cellules du pied, dans les cellules de la tête des trichomes et dans certaines cellules de l'épiderme racinaires et de l'apex racinaire.

## ***Conclusion générale***

Ce profil racinaire suggère que ce fragment interviendrait aussi dans la répression du  $P_{1.1NSTPSO2a}$  certaines zones de la racine.

Une seconde approche moléculaire nous a permis d'identifier un facteur de transcription potentiel NsZnf. Cette protéine est capable d'activer la transcription du gène *HIS3* uniquement en présence du fragment 400c dans la levure. Cette protéine nucléaire est la première à être identifier et caractériser dans les trichomes de solanacées. Cette protéine fait parti des GATA-zincFinger à un seul doigt de zinc. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence une interaction directe entre le fragment 400c et la protéine NsZnf. Cette protéine possède également un domaine de localisation nucléaire et un domaine TIFY sans doute impliqué dans l'homodimérisation. Enfin la présence d'un domaine TIFY suggère qu'elle appartient aussi à la famille des protéines ZIM (selon la nomenclature de Niishi *et al.* 2000. Ces protéines ont été retrouvées dans différents organes de la plante d'*Arabidopsis thaliana* dont les organes reproducteurs mais aucune fonction ne leur a été attribuée à ce jour.

A plus long terme, l'objectif sera d'utiliser les éléments 4c et 400c pour construire un promoteur spécifique du trichome glandulaire. Ce promoteur pourra être placé en amont d'un promoteur minimum. Ce promoteur chimérique sera lui-même placé en amont du gène d'intérêt. L'expression du transgène pourra être augmentée spécifiquement dans les lignées sources de *N.sylvestris*.

## **Matériels et Méthodes**

### ***I. Matériels biologiques et conditions de culture***

#### ***A. Matériel végétal***

##### **1. Variétés de tabac**

L'ensemble du travail de thèse a été réalisé principalement sur *Nicotiana tabacum* cv. *sylvestris* de la famille des Solanacées. Le tabac sylvatique est une plante annuelle dont le cycle de culture peut varier de 3 à 6 mois à partir de la mise en terre. *Nicotiana tabacum* cv. *Benthamiana* a été utilisée pour la transformation transitoire par biolistique des constructions GUS.

##### **2. Milieux et conditions de culture**

###### **a) Culture en terre**

La culture des plantes en terre se fait dans du terreau préalablement imbibé d'eau, autoclavé (20 min à 120°C) puis traité au Trigard (larvicide de moucheron, 0,2g en solution dans un litre d'eau sont mélangés au terreau). Les graines sont semées en pots individuel sans stérilisation de surface préalable. Les pots sont recouverts d'un film en plastique pendant 13 à 16 jours afin de maintenir une atmosphère saturée en eau jusqu'à apparition des cotylédons. Ils sont placés en chambre de culture à 23°C où s'alterne 16h de lumière et 8h d'obscurité (jours longs). L'hygrométrie est à environ 60%. L'éclairage est réalisé par un panachage de néons blancs (Mazda Fluor 36W) et horticoles (Orzam Fluora 36W) donnant aux plantes une intensité lumineuse de  $70\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . L'arrosage se fait par subirrigation deux fois par semaine.

###### **b) Culture in vitro**

Toutes les manipulations de culture *in vitro* sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Avant d'être semées *in vitro*, les graines de la lignée RNAi *NsTPSO2a1.7* sont stérilisées par immersion dans une solution de chlore (dissolution d'une pastille de 1,5g dans 40 mL d'eau stérile) diluée au cinquième. Environ cinquante graines sont traitées par pipetage doux pendant 5 min. Après décantation des graines, la solution de chlore est éliminée et les graines sont lavées cinq fois à l'eau stérile. Les graines restent humides.

Les graines stériles humides sont directement semées sur milieu GERO stérilisé par autoclave [Sels de Murashige et Skoog (Sigma, 4,4 g/L) ; Saccharose (30g/L) ; pH 5,7 (KOH 1N) Phytigel (2 ,5g/L)]. Ce milieu de base est complété par des solutions d'antibiotiques pour assurer la sélection des plantes transformées. Des hormones auxines et/ou cytokinines sont également rajoutées au milieu pour assurer la différenciation foliaire des cals et la différenciation racinaires in vitro. Les cultures se font dans une chambre en jours longs à 23°C avec un éclairage délivré par des néons blancs (Mazda Fluor 36W) et des néons horticoles (Orzam Fluora 36W) donnant aux plantes une intensité lumineuse de  $70\mu\text{M.S}^{-1}\text{cm}^2$ . L'hygrométrie à l'intérieur des boîtes est très élevée aussi le transfert ultérieur des plantules sur terreau est suivi de l'ajout d'un film sur les pots afin d'éviter un choc hygrométrique.

### **c) Induction de cals et régénération de plantes**

Après la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, les disques foliaires sont déposés sur un milieu de coculture CCM1 (CoCulture Medium 1) [Sels de Murashige et Skoog (Sigma, 4,4 g/L) ; Saccharose (30g/L) ; 6-Benzylaminopurine (BA, Sigma) 1mg/L dissout dans un volume minimum de NaOH 1N;  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (BA, Sigma) 1mg/L, dissout au préalable dans de l'éthanol 95°C; pH 5,7 ; Phytigel (2,5g/L)] pendant 48h en jours long à 23°C avec un éclairage de  $70\mu\text{M.S}^{-1}\text{cm}^2$ . Par la suite, les disques sont transférés sur un milieu sélectif de différenciation foliaire SMKmCa [Sels de Murashige et Skoog (Sigma, 4,4 g/L) ; Saccharose (30g/L) ; 6- Benzylaminopurine (2mg/L) ;  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (0,2mg/L) ; Carbanecilline (100mg/L) ; Kanamycine (200mg/L) pH 5,7, Phytigel (2 ,5g/L)]. Les cals sont transférés sur milieu frais SMKmCa une fois par semaine jusqu'à obtention de limbes. Une fois différenciée, la future plantule est transférée sur un milieu sélectif de différenciation racinaire RMKmCa [Sels de Murashige et Skoog (Sigma, 4,4 g/L) ; Saccharose (30g/L) ; Indole-3-Acetic Acid (Sigma) 50 $\mu\text{g/L}$  ; 6-Furfurylaminopurine (Kinétine, Fluka) ; Carbanecilline (100mg/L) ; Kanamycine (200mg/L) pH 5,7 ; Phytigel (2 ,5g/L)]. Les plantules sont transférées sur milieu neuf RMKmCa une fois par semaine jusqu'à l'apparition de racines. Dès lors, les plantules bien différenciées sont isolées par dissection des cals et sont mises en terre.

**B. Système bactérien utilisé**

**1. Génotypes des souches utilisées**

Souches	Génotype	Résistance	Manipulations
<i>E. coli DH5α</i>	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ-	Acide Nalidixique	Clonage et amplification de plasmides
<i>E. coli</i> DB3-1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm <sup>r</sup> ) xyl5 Δleu mtl1	Protéine CcdB, streptomycine	Gateway, manipulation du vecteur pDONR <sup>Tm</sup> 22 1
<i>E. coli</i> XL2blue	TetR Δ (/mcrA) 183 Δ (mcrCB-hdsSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96relA1 lac/ Hte [F'/ proAB lacIqZΔM15 /Tn/10/(TetR) Amy CamR]	Tétracycline	Clonage et amplification de plasmides
<i>E. coli</i> BL21DE3	F- ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5- T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Aucune	Induction de protéines
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58pGV3121	Gentamycine Rifampicine	Transformati on stable dans la plantes

**Tableau III** : Souches bactériennes utilisées

**2. Milieux et conditions de cultures bactériennes**

Les cultures bactériennes sont effectuées en milieu riche LB (Luria Bertani Broth : [peptone tryptique de caséine (10g/L), extrait de levure (5g/L), NaCl (12g/L) ; Agar (15g/L (boîtes de pétris seulement)) pH : 7,5]) à 37°C (*E. coli*) et 28°C (*Agrobacterium tumefaciens*).



En milieu liquide, le volume de la culture bactérienne correspond à 1/5 du volume de l'ermenMeyer utilisé, pour une oxygénation optimale de la culture.

La sélection des bactéries d'intérêt est réalisée en supplémentant le milieu par un ou plusieurs antibiotiques selon le vecteur et la résistance de la souche bactérienne utilisée, aux concentrations décrites dans le tableau IV.

<b>Souches</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Concentration finale</b>
<i>Escherichia coli</i> (DH5 $\alpha$ , X11blue)	Ampicilline	100 $\mu$ g/ml
	Kanamycine	50 $\mu$ g/ml
	Spectinomycine	100 $\mu$ /ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58pGV3121)	Gentamycine	20 $\mu$ g/ml
	Spectinomycine	100 $\mu$ g/ml
	Rifampicine	50 $\mu$ g/ml

**Tableau IV: Concentration finale des antibiotiques utilisés selon les souches bactériennes**

### **C. Système levure utilisé**

#### **1. Souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée**

La souche Y187 (CLONTECH) est utilisée pour les tests simple-hybride. Son génotype est *MAT $\alpha$* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 $\Delta$* , *met $^{-}$* , *gal80 $\Delta$* , *MEL1*, *URA3::GALI UAS -GALITATA-lacZ*.

#### **2. Milieux et conditions de culture**

A partir d'un stock glycérol fournit par CLONTECH, les levures sont étalées sur milieu riche YPDA [Difco peptone (20g/L), extrait de levure (10g/L), 2% glucose (p/v), L-Adénine hémisulfate (0,2%), Agar (20g/L); pH 5,8] à 30°C. Une colonie est ensuiteensemencée dans du milieu YPDA liquide sous agitation à 180 rpm à 30°C pendant 48h.

Cette culture est utilisée pour ensemer des volumes plus importants d'YPDA lors de la préparation de levures compétentes lors des expériences de transformation. La sélection des levures transformées se fait sur un milieu minimum SD [Yeast Nitrogen Base sans acides aminés (6,7g/L), 2% glucose (p/v)] supplémenté par une solution « Drop-out » contenant tous les composés d'auxotrophie (acides aminés et bases azotées) hormis ceux permettant de réaliser la sélection phénotypique (Leucine et/ou Histidine et/ou Tryptophane) soit SD-LT ou SD-LTH dans le cas de nos milieux permissif ou non permissif respectivement. Certains milieux contiennent du 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT inhibiteur compétitif de l'enzyme de biosynthèse de l'histidine codée par le gène *HIS3*) (Sigma). L'ajout du 3-AT se fait après autoclavage à partir d'une solution stock 2M, stérilisée par filtration.

Solution Dropout 10X :

Nutriments	Concentration 10X
L-Adénine hémissulfate	200mg/L
L-Arginine HCl	200mg/L
L-Histidine HCL monohydrate*	200mg/L
L-Isoleucine	300mg/L
L-Leucine*	1000mg/L
L-Lysine HCl	300mg/L
L-Méthionine	200mg/L
L-Phénylalanine	500mg/L
L-Thréonine	2000mg/L
L-Tryptophane*	200mg/L
L-Tyrosine	300mg/L
L-Uracile	200mg/L
L-Valine	1500mg/L

\*L'absence de ces trois acides aminés dans la solution DO permet la sélection des levures transformées.

## **II. Manipulations génétiques des plantes**

### **A. Transformation stable de *Nicotiana tabacum* cv. *sylvestris* RNAi (lignée intron-hairpin *NsTPSO2a1.7*)**

#### **1. Transformation par régénération de cals**

Le tabac sylvatique est une plante annuelle dont le cycle de culture peut varier de 3 à 6 mois à partir de la mise en terre. Les plantes utilisées sont d'une lignée homozygote portant le transgène ihpCBTS (lignée # 904), produites par LYBROPHYT. Cette lignée ne produit plus de CBT-diol à la surface des feuilles. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 utilisée dans cette expérience est une souche désarmée dont une partie des gènes, la région T-DNA localisée sur le plasmide Ti et responsable de la formation du « *crown gall* », a été éliminée. Des disques foliaires obtenus à partir de *N.sylvestris* et de la lignée # 804 ont été infectés selon le protocole de Horsch *et al.*, (1985), par la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 contenant les vecteurs pKGWFS7 (Annexe) ayant le gène de résistance à la kanamycine chez la plante et les différents transgènes d'intérêt. Les transformants ayant intégré une copie du T-DNA, sont sélectionnés sur un milieu gélosé contenant les hormones de différenciation ainsi que de la Kanamycine (200mg/L) et de la Carbeniciline (100mg/L). Une fois différenciées, les plantes résistantes sont transférées en chambre de culture confinée à 23°C.

#### **2. Sélection des transformants**

Une partie des graines T1 issues des plantes transformées T0 sont, en principe, acquies le T-DNA possédant la construction et le gène de sélection Kana<sup>r</sup> (NPTII) conférant la résistance à la kanamycine. Les graines T1 récoltées sont stérilisées et semées sur un milieu GERO gélosé supplémenté en kanamycine. A raison de 5 lignées par construction, une centaine de graines ont été semées pour chacune des lignées afin d'obtenir au moins ¼ des plantules hétérozygotes portant le transgène. Les plantes résistantes sont ensuite mises en terre et font l'objet de diverses manipulations.

### **B. Transformation transitoire de *N. benthamiana* par biolistique**

La transformation transitoire est utilisée ici comme approche préliminaire pour l'analyse fonctionnelle du promoteur P<sub>1.1NsTPSO2a</sub>. L'expression de la protéine Glucoronidase, contrôlée par le promoteur P<sub>1.1NsTPSO2a</sub> entier ou modifié par différentes délétions, pourra être visualisée dans les cellules épidermiques de *N.benthamiana*.

Cette technique consiste à bombarder des tissus végétaux (disques foliaires) avec des micro-particules métalliques (or ou tungsten de 2 à 5 microns) sur lesquelles sont adsorbés les ADN à transférer dans les cellules. L'appareillage utilisé est un canon à particule utilisant de l'hélium : le « PDS-1000/He Biolistic® Particule Delivery System » (Biorad).

### **1. Préparation ex-temporannée des microbilles**

La première étape consiste à préparer une solution mère de billes d'or de 1µm : 60 mg de billes sont agités (vortex) pendant 2 min dans 1 ml d'éthanol 90% puis centrifugés à 1000g durant 1 min afin d'éliminer le surnageant. Les billes sont ensuite resuspendues dans 1 mL d'eau milliQ stérile et conservées à 4°C.

### **2. Adsorption de l'ADN**

La deuxième étape permet l'adsorption de l'ADN plasmidique sur les billes. 5µg d'ADN sont mélangés à 50 µL solution mère de billes (~ 3 mg) en présence de CaCl<sub>2</sub> à 1M (soit 50 µL d'une solution à 2,5M) et de spermidine à 16 mM (soit 20 µL d'une solution à 0,1M). Le mélange est vortexé pendant 5 min puis centrifugé à 1000g pendant 10s. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est lavé par 250µL d'éthanol 100% puis stocké brièvement dans la glace.

### **3. Préparation des disques foliaires**

Des disques foliaires de 1cm Ø de *N.benthamiana* sont réalisés au préalable du bombardement. Les échantillons foliaires sont disposés par trois au centre d'une boîte pétri (Ø 9 cm) contenant du milieu MSAR [(Sels de Murashige et Skoog (Sigma, 4,4 g/L) ; Saccharose (30g/L)] gélosé. C'est la face abaxiale des feuilles qui est bombardée. L'expérience est réalisée en conditions stériles sous hotte à flux laminaire et en utilisant des instruments stérilisés à l'éthanol 70%.

### **4. Bombardements**

Trois bombardements sont réalisés en triplicat pour chacune des constructions, à raison de 5 à 10 µL de solution de billes adsorbées d'ADN par bombardement. La solution est déposée sur un disque « DNA carrier » qui est ensuite séché pendant 5 min.

Celui-ci est ensuite placé entre le disque de rupture de 990 psi et l'écran d'arrêt. Le plateau portant l'échantillon est placé à l'avant dernier cran de la chambre. Le vide est fait jusqu'à atteindre une pression de 25 mm Hg puis l'échantillon est bombardé.

## **5. Détection de l'expression transitoire du gène rapporteur *GUS***

Après la transformation, les boîtes sont placées 24h à l'obscurité puis transférées en chambre de culture à 23°C pendant 24h. Les échantillons sont ensuite colorés en présence du substrat X-gluc, (Cf paragraphe V) décolorés et observés sous loupe binoculaire ou microscope en lumière continue. Cette approche préliminaire permet de déterminer l'expression du rapporteur GUS en fonction des délétions du promoteur.

### **C. Transformation transitoire par infiltration de *N. benthamiana***

La transformation transitoire permet d'observer en quelques jours l'expression et la localisation intracellulaire d'une fusion traductionnelle (type GFP), ce qui est un avantage. La technique par infiltration consiste à faire pénétrer dans les cellules une suspension d'*Agrobacterium*. Cette dernière est transformée avec un plasmide pKGWFS7 (Annexe) ayant le gène d'intérêt fusionné au gène rapporteur. Une pré-culture de 5 ml (LB + antibiotiques) d'*Agrobacterium* portant la construction d'intérêt (ou les deux constructions dans le cas du BiFC, Bimolecular fluorescent complex), est réalisée sur la nuit à 28°C. Le lendemain, 1 ml de la pré-culture est ajouté à 4 ml de milieu frais et placé sous agitation à 28°C. Lorsque la DO<sub>600nm</sub> atteint 0.8, 2 ml de culture sont centrifugés (5000 rpm, 5 min), le culot de bactéries est re-suspendu dans 2 ml d'eau. Cette étape de lavage est répétée deux fois, puis les bactéries sont re-suspendues dans 2 ml de Tp d'infiltration. La solution est alors infiltrée sous pression dans une feuille de tabac, d'une dizaine de cm de long, à l'aide d'une seringue de 1 ml (sans aiguille). L'extrémité de la seringue est appuyée contre la face abaxiale de la feuille, entre les nervures, tout en étant maintenue de l'autre côté par l'index. La solution d'*Agrobacterium* diffuse de façon visible sous la couche épidermique. Il faut attendre deux jours pour que les cellules expriment la construction de façon optimale. L'expression s'arrête après 4 jours.

- <b>Tp d'infiltration</b> :	Saccharose	2%(p/V)
	Glucose	1%(p/V)
	Acétosyringone	0,2 mM
	MES pH 5,4	20 mM

### **III. Biologie moléculaire**

#### **A. Techniques de clonage et transformation bactérienne**

##### **1. Clonage enzymatique**

###### **a) Amplification d'un fragment par PCR**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier spécifiquement le fragment d'ADN, entre deux amorces, à partir d'ADN cloné ou génomique, grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable (Pfu Polymerase Invitrogen). La réaction est cyclique afin que l'amplification soit exponentielle. Chaque cycle comprend 3 étapes : une dénaturation des doubles brins (94°C), une hybridation des amorces utilisées (60°C) et une néosynthèse d'ADN par la Taq polymérase (72°C). Les amorces, situées de part et d'autre du fragment, font en moyenne 25pb. Un site de restriction est généralement rajouté en 5' de chaque amorce pour faciliter le clonage par la suite. La réaction de PCR s'effectue avec de l'ADN plasmidique (100ng) contenant la matrice (P<sub>NsTPSO2a</sub>). La matrice est mise en présence du MIX PCR (Cf paragraphe III-A-4a) et que l'on place ensuite dans un thermocycleur.

###### **b) Clonage par sites de restriction**

Le fragment (obtenu par PCR ou par restriction) et le vecteur sont digérés par une ou deux enzymes de restriction selon la stratégie de clonage. Généralement, deux enzymes différentes sont utilisées, d'une part pour éviter une recircularisation du vecteur et de l'insert et d'autre part d'orienter l'insert dans un seul sens. Les deux fragments d'ADN sont ensuite purifiés sur gel d'agarose avant la réaction de ligation *in vitro*. Pour cette réaction enzymatique, il est nécessaire d'avoir un rapport moléculaire de trois voir quatre molécules d'insert pour une molécule de vecteur.

**c) Digestion enzymatique d'ADN**

1 à 3 µg d'ADN sont incubés avec l'enzyme de restriction en présence du tampon adéquat pendant 1h au bain marie à 37°C (température d'activité optimale de la plupart des enzymes). Pour une digestion totale, le nombre d'unité d'enzyme est déterminé en fonction de la quantité d'ADN et du nombre de sites de coupure. D'une manière générale, 10 unités d'enzyme sont utilisées pour un volume réactionnel de 20µl final. Lorsqu'une double digestion est réalisée, il est nécessaire de vérifier la compatibilité des deux enzymes pour un même tampon utilisé. Si ce n'est pas le cas, il est nécessaire de faire deux digestions successives en purifiant l'ADN après la première digestion. Le volume réactionnel ne doit pas contenir plus de 5% de glycérol (les enzymes étant stockées dans du glycérol à 50%) afin d'éviter une perte de spécificité des enzymes.

**d) Electrophorèse et purification des fragments d'ADN**

Les fragments d'ADN, auxquels on ajoute du bleu de dépôt (3% glycérol (v/v), 0,025% bleu de bromophénol (p/v)), sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose dans un tampon TBE 0,5X (Tris Borate 90mM pH 8, EDTA 1mM) sous une tension électrique de 100 V. La concentration du gel d'agarose varie de 0,8% à 3% selon la taille de la bande d'ADN à détecter. Un marqueur de poids moléculaire est déposé en parallèle afin d'évaluer la taille des fragments d'ADN. Le Smart Ladder (Eurogentec) est utilisé comme marqueur de taille pour les fragments d'ADN dont la taille est supérieure à 100pb et le Low Molecular Weight (Biolabs) pour les fragments en deçà de 100pb. Le gel est ensuite immergé dans une solution de bromure d'éthidium (2µg/mL) pendant 30 min. suivi d'une observation des bandes sous UV. Les fragments d'ADN intéressants sont découpés et purifiés en utilisant le Nucleospin extract 2 (Marcherey Nalgel) selon les recommandations du fournisseur.

**e) La ligation**

La ligation de l'insert et du vecteur se fait à 24°C pendant 2 à 4 heures ou pendant une nuit à 4°C. Le volume réactionnel contient : 4µl Tampon 5X, 3 à 30 fmol de vecteur, 9 à 90 fmol d'insert, 1 unité de T4 DNA ligase (Invitrogen) pour un volume réactionnel de 20 µL. Ces paramètres peuvent varier selon que l'ADN a des bouts cohésifs ou francs. Le produit de ligation sert ensuite à la transformation des bactéries compétentes.

## **2. Clonage d'un produit PCR par T/A cloning**

Le plasmide pGM-Teasy (Promega) a été utilisé pour le clonage de produits PCR. Il se présente sous forme linéaire, ouvert au niveau de la séquence codante du gène lac Z $\alpha$  (possibilité de sélection visuelle « blanc bleu »). Il possède une base T flottante aux extrémités 3' qui s'apparie avec les bases A flottantes en 3' de l'amplicon (obtenues avec une TaqPolymérase Bioline capable de rajouter des A aux amplicons). Les réactions de clonage sont réalisées selon les recommandations des fournisseurs dans un volume réactionnel de 10  $\mu$ L final. 2  $\mu$ L de cette réaction sont utilisées pour la transformation de bactéries compétentes.

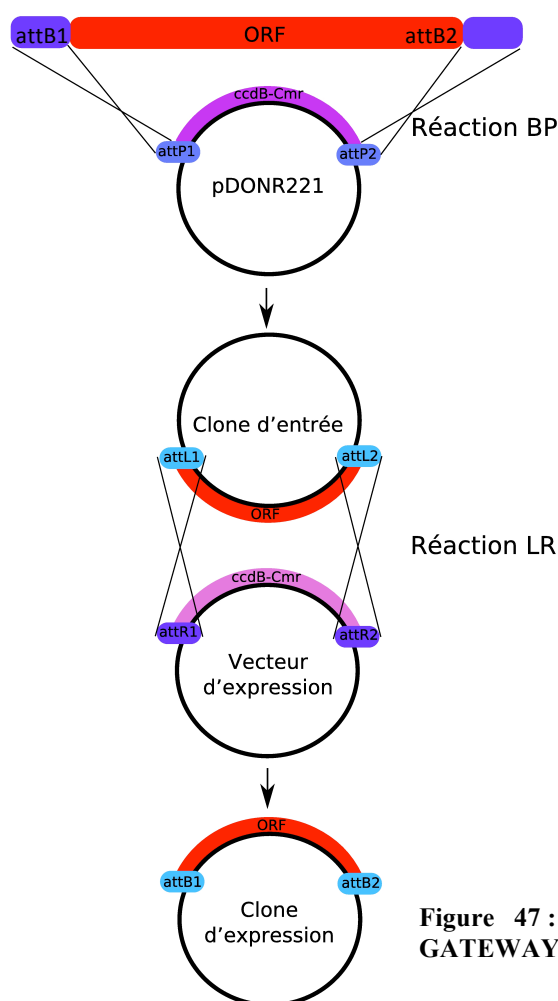
## **3. Clonage GATEWAY™**

Le système de clonage *Gateway* présente de nombreux avantages et facilite notamment le clonage d'un même insert dans différents vecteurs, et permet de s'affranchir des étapes de restriction-ligation obligatoires lors d'un clonage classique. L'insertion d'un insert d'ADN est spécifique et directionnelle (conservation du cadre de lecture), et le moyen de sélection est rapide. Il est alors facile d'obtenir différents plasmides d'expression à partir d'un seul plasmide d'entrée.

### **a) Principe**

La technologie *Gateway* s'appuie sur les propriétés de recombinaison site-spécifique du bactériophage lambda au niveau des séquences *att* du génome de l'hôte reconnues par la recombinase du phage qu'il utilise naturellement pour s'intégrer dans le génome d'*E. coli* lors du cycle lysogénique (Landy, 1989). Le système de clonage *Gateway* se fait en deux étapes. Lors de la première, l'ADN d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant un couple d'amorces contenant chacune une extension *attB* en 5'. Une première recombinaison *in vitro* dite « Réaction BP » permet d'insérer le produit PCR avec ses extensions *attB* dans les sites *attP* du vecteur pDONR™221 (Invitrogen) conduisant au clone dit « d'entrée ». Ce dernier est utilisé lors de la deuxième recombinaison dite « Réaction LR » entre les deux sites *attL* et les deux sites *attR* d'un vecteur de destination contenant les gènes rapporteurs d'intérêt (Figure 47).





**Figure 47 : Schéma illustrant les réactions BP et LR du clonage GATEWAY™**

Les deux réactions de recombinaison BP et LR nécessitent respectivement le mix BP Clonase™ et LR Clonase™ (Invitrogen). Ces mélanges contiennent les enzymes indispensables à la recombinaison : Int, IHF et Xis (présente exclusivement dans le mix LR Clonase). Que ce soit le vecteur pDONR221™ ou les vecteurs de destinations, ils possèdent toujours la cassette ccdB entre les sites attP ou attR. Cette cassette code pour une protéine capable d'interagir avec la Gyrase de la plupart des souches d'*E.coli*, ce qui empêche leur croissance. C'est grâce au mécanisme de recombinaison que la cassette est perdue, ce qui permet de sélectionner les bactéries portant la bonne construction. Enfin, l'amplification des vecteurs pDONR221™ et des vecteurs de destination avant clonage d'un fragment se fait dans une souche résistante DB3-1.

#### **b) Réaction de recombinaison BP et LR**

Environ 0,1 à 0,3µg de produit PCR avec extensions attB (ou de clone d'entrée) sont mélangés respectivement, à 0,3µg de pDONR221™ (ou de vecteur de destination), 1µL de Mix BP (ou LR) Clonase et de tampon TE pH 8,3 pour un volume final de 5µL.

Ce mélange est vortexé brièvement deux fois puis incubé à 25°C pendant 1 heure. La réaction est stoppée par l'ajout de 1 µL de protéinase K (2µg/µL) et en incubant pendant 10 min à 37°C. Le produit est alors utilisé pour la transformation des bactéries par électroporation.

#### 4. Vecteurs utilisés et constructions réalisées

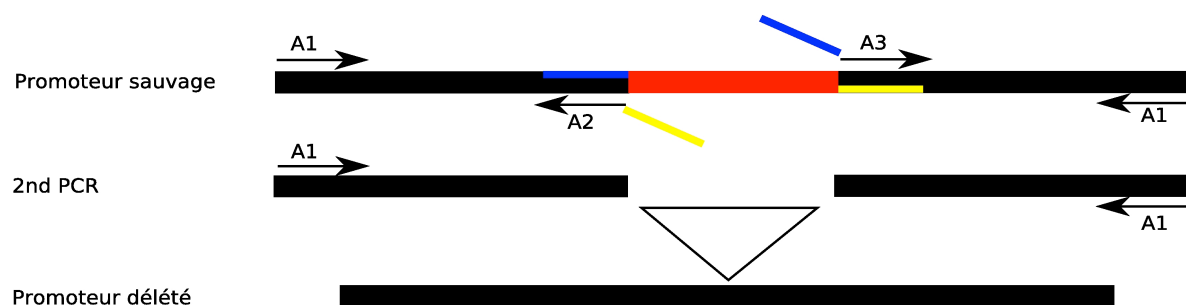
Vecteurs	Provenance	Taille	Utilisation	Sélection dans la bactérie
pEntrR2L3	Invitrogen	6,2kb	Expression transitoire dans N.benthamiana	Kanamycine
pBi121	Promega	14,8kb		
pBi101	Promega	5,3kb		
pGt-GUS	Librophyt			Ampicilline
pDONR™221	Invitrogen	4,8kb	Vecteur d'entrée GATEWAY	Kanamycine
pKGWFS7	Plant Systems Biology VIB-Ghent University	12,7kb	Vecteur de destination GATEWAY	Spectinomycine
pK7WGF2	Plant Systems Biology VIB-Ghent University	11,8kb	Vecteur de destination GATEWAY	Spectinomycine
pDEST17	Invitrogen	6354	Vecteur de destination GATEWAY	Ampicilline
pGADT7recAB	Clontech	8,2kb	Expression dans la levure (test simple hybrid)	Ampicilline
pHis2		7,2kb		Kanamycine

**Tableau V : Différents vecteurs utilisés dans les manipulations moléculaires**

**a) Mutagenèse dirigée par PCR de P<sub>NS</sub>TPSO<sub>2a</sub>**

Dix délétions ont été générées sur le promoteur dont cinq délétions séquentielles et cinq délétions contigües. Ces constructions ont été réalisées en utilisant deux couples d'amorces pour chaque délétion (Annexe). Dans le cas des délétions séquentielles, la réaction est simple avec une seule étape de PCR et l'utilisation d'un seul couple d'amorce. Dans le cas des délétions contigües, la réaction nécessite deux étapes. La première permet d'obtenir deux fragments externes (par rapport au site de délétion) chevauchants, ce qui nécessite l'utilisation de deux couples d'amorces [(A1/A2) ; (A3/A4)]. Les fragments obtenus sont ensuite purifiés sur gel puis on procède à la PCR final (A1/A4) pour fusionner les deux fragments et obtenir le promoteur ainsi délété (Figure 48). Le programme utilisé pour l'amplification des fragments est le suivant :

- <u>Condition de PCR</u>	94°C / 5 min
	(94°C / 30 sec, 55°C / 30 sec, 72°C / 1 min) X 30
	72°C / 10 min
- <u>Mélange réactionnel (25µl) :</u>	
	Tampon Taq (10X) 2,5 µl
	MgSO <sub>4</sub> (25 mM) 3,5 µl
	dNTPs (10 mM) 2,5 µl
	Amorces (10 µM) 1 µl de chaque
	Taq Pfu 2 unités
	Matrice 100 ng d'ADN plasmidique
	Eau qsp 25 µl



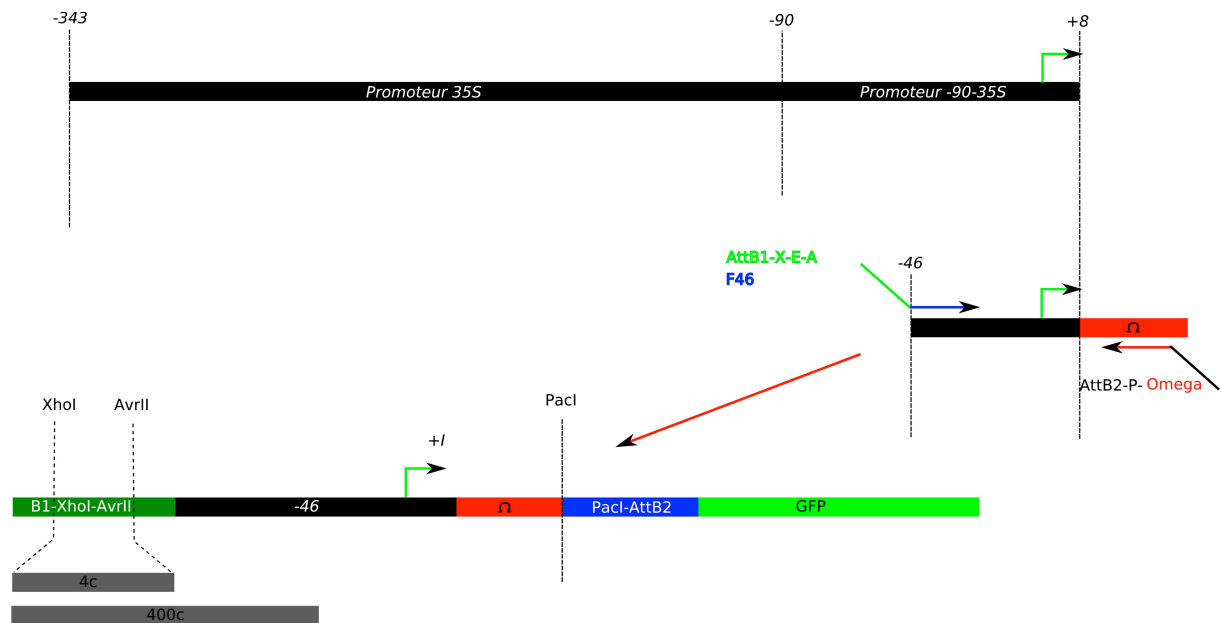
**Figure 48 : Différentes étapes pour la construction d'une délétion interne dans le promoteur sauvage.**

Ces délétions ont été clonées dans le vecteur d'expression pKGWFS7 en utilisant les sites de restrictions XhoI/PacI, pour l'analyse fonctionnelle *in vivo*.

Les clones d'expression, ainsi obtenus, ont été dans un premier temps adsorbés sur billes d'or pour une analyse de l'expression transitoire dans *N.benthamiana* puis transformées dans la souche *Agrobacterium* GC3121 pour une transformation stable dans *N.sylvestris* par régénération de cals.

**b) Fusions transcriptionnelles des régions 400c, 4c à un promoteur minimum 35S (-46) du CaMV, en amont du rapporteur GUS**

La séquence minimale de 46pb du promoteur 35S a été introduite par clonage classique dans le vecteur d'expression pKGWFS7 grâce aux sites de restrictions AvrII et PacI. Par ailleurs, les séquences cis 400c et 4c sont amplifiées par PCR en utilisant des oligos spécifiques contenant les sites de restrictions Xho/AvrII. Puis, les éléments cis ont été sous clonés dans le vecteur pKGWFS7 sous le contrôle du p35Smin (-46) (Figure 49).



**Figure 49 : Sous clonage des éléments 400c et 4c sous le contrôle du p35S(-46).**

**c) Clonage des éléments cis 400c et 4c dans le pHis2**

Les éléments 400c et 4c ont été amplifiés par PCR en utilisant des oligos incluant les sites de restrictions MluI en 5' et EcoRI en 3'. Les fragments ont été ensuite clonés dans le vecteur rapporteur pHis2 (Annexe) (CLONTECH) afin de procéder au crible simple hybride.

## **5. Transformation bactérienne, amplification de plasmide et séquençage**

### **a) Préparation de bactéries thermo-compétentes**

Une pré-culture saturée de 3 ml est utilisée pour ensemençer 500 ml de SOB qui sont mis en culture à 28°C sur la nuit. Le lendemain, lorsque la  $DO_{600}$  a atteint 0.4, les bactéries sont incubées 30 min sur la glace, puis sont centrifugées 2 fois 2500g / 4°C / 10 min. Le culot est repris dans 150 ml de tampon TB froid après la première centrifugation et dans 15 ml après la seconde. 1,2 ml de DMSO sont ajoutés puis les bactéries sont placées 10 min dans la glace. Les cellules sont aliquotées par fractions de 300µl et stockées à -80°C.

<u>-SOB (500ml):</u>	10 g bacto tryptone	<u>-TB (180 ml):</u> 1,8 ml PIPES 1M
	2,5 g extrait de levure	10 ml $MnCl_2$ 1M
	0,2 ml $NaCl$ 5M	2,7 ml $CaCl_2$ 1M
	1,25 ml $KCl$ 1M	45 ml $KCl$ 1M
	5 ml $MgSO_4$ 1M	pH 6.7, filtrer
	pH 7, autoclaver	

### **b) Transformation par choc thermique**

Les bactéries thermo-compétentes sont décongelées sur la glace puis incubées 30 min à 4°C avec une partie du produit de ligation ou de mini-préparation. Le choc thermique est réalisé en incubant rapidement les bactéries à 42°C durant 45 secondes. Elles sont ensuite replacées immédiatement dans la glace pendant 2 minutes. Si nécessaire, une culture d'expression est réalisée en incubant les bactéries dans 500 µl de LB pendant 1h à la température de culture. Les bactéries sont ensuite étalées sur le milieu de sélection et mises en culture.

### **c) Transformation par électroporation**

L'électroporation est une technique de transformation qui présente un très bon rendement et permet la transformation de vecteur de grande taille (supérieur à 10 kpb).

Afin d'augmenter l'efficacité de transformation et d'éviter tout phénomène d'arc électrique lié à la présence de sels dans la solution de ligation, celle-ci est diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau déionisée. 1 µl de réaction de ligation est ensuite ajouté à 40 µl d'une solution de bactéries électro-compétentes maintenues dans la glace. Après une minute dans la glace, la solution est transférée dans une cuve à électroporation de 0,2cm d'espacement entre les électrodes. L'électroporation s'effectue dans l'appareil « Gene Pulser™ » (*Biorad*) à 2,5 kV (= 2500 volts) dans des cuvettes de 0,2cm, soit une décharge de 12 500 Volt/cm. Immédiatement après électroporation, environ 300 µl de LB sont ajoutés à la solution de bactéries transformées sont incubée pendant 1h avant de les étalées sur le milieu sélectif.

### **d) Mini-préparation de plasmide**

Les extractions de plasmides ont été réalisées à l'aide des kits « Plasmid miniprep » (*QIAGEN*) ou « nucleospin plasmid » (*Macherey Nagel*) selon les indications des fournisseurs. Deux ml de culture en phase stationnaire sont nécessaires pour réaliser une extraction. Concernant les maxi-préparations, un kit du même fournisseur est utilisé sur une culture de 300 mL. La présence de l'insert est vérifiée par une seconde digestion enzymatique, puis les vecteurs recombinants sélectionnés sont contrôlés par séquençage de l'insert pour vérifier l'absence d'erreur de clonage ou de mutagenèse lors de la PCR.

### **e) Séquençage**

Des mutations sont susceptibles d'être apparues dans les fragments clonés dues aux erreurs de la polymérase lors de la PCR dans le cas du clonage d'un amplicon ou à l'exposition aux UV dans le cas d'une purification sur gel. Dans tous les cas, il est nécessaire de séquencer les clones obtenus afin de vérifier l'absence de mutations. Les amorces choisies doivent s'hybrider environ 100pb en amont de la région de clonage du vecteur pour obtenir une séquence optimale. Ces amorces sont fournies dans le cas des vecteurs commerciaux. Les réactions de séquençage ont été réalisées sur la plateforme du LECA par Jean-pierre ALCARAZ (UJF) ou par COGENIX selon une technique dérivée de la méthode décrite par Sanger et al. (1977).

**B. Identification de facteur de transcription**

**1. Construction d'une banque d'ADNc de trichomes de *N.sylvestris***

**a) Extraction et préparation d'ARN totaux de trichomes de *N.sylvestris***

La première étape permet d'isoler le maximum de trichomes des deux faces d'une feuille de *N.sylvestris*. Pour ce faire, deux feuilles de papier aluminium sont mises en contact avec de l'azote liquide. Les feuilles de tabac sont congelées sur les deux faces en contact avec le papier d'aluminium. Par la suite un pinceau est plongé dans de l'azote liquide. Grâce à un délicat mouvement proximo-distal les trichomes sont décrochés de la feuille au-dessus d'un mortier refroidi par de l'azote liquide. Les trichomes sont ensuite rassemblés dans un tube Eppendorf RNase free froid. L'extraction d'ARN totaux se fait selon le protocole RNeasy Kit (Qiagen.) La qualité est vérifiée sur un gel d'agarose 1% et la quantité est mesurée par spectrophotomètre DO<sub>260nm</sub>.

**b) Banque à façon d'ADNc de trichomes de *N.sylvestris***

26 µg d'ARN totaux ont été expédiés sous carboglace à Clontech (USA) pour la fabrication de la banque d'ADNc. La synthèse s'est faite en utilisant la technologie SMART décrit sur le site <http://www.clontech.com/products/detail> . Les ADNc pleine longueur ont été clonés dans le vecteur pGADT7recAB sous forme de fusions avec le domaine d'activation (AD) du facteur de transcription GAL4 pour le crible simple hybride. Ce vecteur possède la particularité de posséder deux sites de restriction SfiI de part et d'autre de l'ADNc permettant son excision ultérieure. La banque d'ADNc a été amplifiée dans la souche DH10B et reçue sous forme de culture bactérienne (LB à 25% de glycérol). La qualité de la banque est vérifiée en la digérant par l'enzyme de restriction SfiI et déposé sur gel d'agarose 1%.

**2. Crible simple hybride de la banque d'ADNc de trichomes de *N.sylvestris*:**

**a) Principe d'un crible simple hybride**

Le simple-hybride permet d'identifier des facteurs de transcription spécifiques d'une séquence cible connue.

Elle permet d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec un fragment d'ADN connu et d'accéder directement à leur cDNA et/ou d'analyser après mutagenèse dirigée les nucléotides et/ou acides aminés impliqués dans l'interaction.

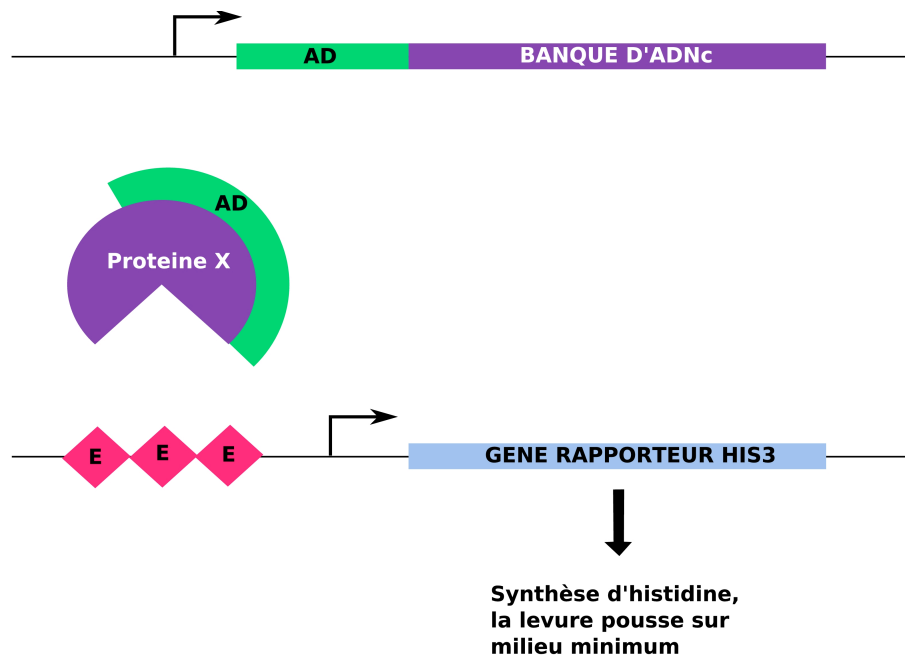


Figure 50 : Principe schématique du simple hybride.

**b) Fusions transcriptionnelle dans pHis2 et traductionnelle dans pGADT7RecAB**

*- Fusion transcriptionnelle cible:HIS3*

L'ADN cible (4c et 400c) sont clonés dans un vecteur rapporteur contenant généralement le gène de sélection *HIS3*. Seules les levures exprimant une protéine capable de se fixer sur la cible vont pousser sur le milieu minimum (Figure 50).

*- Fusion transcriptionnelle AD:cDNA*

Dans le système simple-hybride, les « DNA-binding proteins » potentielles sont exprimées en fusion avec le domaine d'activation (AD) du facteur de transcription Gal4. Les ADNc ont été clonés dans le vecteur d'expression pGADT7RecAB (Annexe).



**c) Cellules Y187 compétentes**

Une colonie de levure est isolée sur milieu YPDA solide et mise en pré-culture dans 2 ml de milieu riche liquide YPDA à 30°C pendant 48 heures. 150 ml de milieu riche YPDA sont ensemencés par 1 ml de cette pré-culture et mis sous agitation à 230 rpm à 30°C pendant 18h de sorte à atteindre une  $DO_{600} \geq 1,5$ . Ensuite, 1 L de YPDA est ensemencé par 35ml de cette culture de levures saturée. La  $DO_{600}$  initiale de la culture doit être comprise entre 0,2 et 0,3. La culture est mise sous agitation à 230 rpm à 30°C et la  $DO_{600}$  est vérifiée toutes les heures jusqu'à atteindre  $0,6 \pm 0,1$ . La culture est ensuite centrifugée à 1000 g pendant 5 min à température ambiante dans des tubes de 50 ml stériles. Les surnageants sont éliminés et chaque culot est repris dans 25 ml d'eau stérile. Les cultures sont lavées et centrifugées une deuxième fois à 1000g pendant 5 min. Les surnageants sont éliminés et les culots sont délicatement resuspendus dans une solution stérile de 1XTE/LiAC préparé extemporanément. Enfin l'ensemble des levures compétentes est rassemblé dans un même tube donnant un volume d'environ 10ml. Elles peuvent être conservées à température ambiante pendant 4h au maximum.

**d) Cotransformation pHis400c ou pHis4c/pGADT7RecAB-ADNc**

Etant donné les volumes importants qui sont utilisés pour la cotrantransformation, il est nécessaire, de se munir d'un erlenMeyer de 250ml. Dans ce récipient, sont ajoutés dans l'ordre suivant :

- 0,5 mg de pHis400c (0,830 µg/ml) ou pHis4c (0,640 µg/ml)
- 0,250 mg de pGAD-ADNc (4 µg/ml)
- 30 mg d'ADN de sperme de saumon (2mg/ml)
- 10 ml de levures compétentes

L'ensemble est mélangé et vortexé à homogénéité. Ensuite, 60 ml de PEG/LiAC stérile (80 ml PEG3350 50%, 10 ml TE 10X et 10 ml LiAC 10X) sont rajoutés au mélange et vortexés à haute vitesse. Une fois mixé, le mélange est séparé en 3 tubes de 50 ml stériles et mis à incuber pendant à 30°C pendant 30 min à 200 rpm. 7 ml de DMSO sont mélangés aux levures par inversion. On procède ensuite au choc thermique à 42°C (bain marie) pendant 45 min, les tubes sont mélangés par inversion tous les quart d'heure environ. Les levures transformées sont ensuite placées dans la glace pendant 2min avant d'être centrifugées à 1000 g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et avec délicatesse, les levures sont resuspendues dans 10 ml d'eau stérile.

**e) Estimation de l'efficacité de la transformation**

350µl de levures transformées sont étalées à l'aide de billes sur un milieu permissif SD-LT. La boîte est placée à 30°C pendant 48h.

L'efficacité de la transformation se calcule de la façon suivante :  $\text{Eff-cotransformation} = \text{Cfu} \times \text{vol total de suspension } (\mu\text{l}) / \text{vol étalé } (\mu\text{l}) \times \text{fact de dilution} \times \text{ADN } (\mu\text{g})$ .

**f) Sélection des clones positifs**

La sélection des levures se fait sur milieu minimum solide SD-LTH supplémenté de 75mM d'inhibiteur compétitif 3-Amino-1,2,4-Triazole (2,5M)3-AT pour pHis400c et 90mM pour pHis4c. Environ 350 µl de levures sont étalés par boîtes à l'aide de billes stériles de 0,25 mm Ø. Les boîtes sont ensuite placées à 30°C pendant 48h.

**g) Confirmation des clones candidats positifs**

Les colonies de levures qui se développent sur milieu minimum sont mises en culture en milieu riche (YPDA) à 30°C pendant 24h. On procède ensuite à une extraction d'ADN en utilisant le Kit « NucleoSpin Plasmid » en rajoutant 50 à 100µl de billes de verres 500 µm Ø (SIGMA) pour éclater les cellules. L'ADN est repris dans un volume de 30µL de tampon d'élution. Ensuite, on procède à la transformation de DH5α électro-compétentes. Les bactéries transformées sont étalées sur LB+Ampicilline et transférée à 37°C pendant 14h. Une colonie estensemencée dans 3 ml (LB+Amp) et agitée à 37°C pendant 14h. On procède ensuite à l'extraction de l'ADN plasmidique selon le Kit « NucleoSpin Plasmid ». L'ADN est ensuite digéré par l'enzyme de restriction SfiI et vérifié sur gel d'agarose 1% avant d'être dosé par spectrophotomètre et envoyé pour séquençage.

**h) Clonage de l'ADNc de NsZnf**

- *Clonage dans le vecteur d'expression pDest17*

Ce clonage permettra la surexpression de la protéine NsZnf dans E.coli BL21 sous l'induction d'arabinose (0,2%).

- *Clonage dans le vecteur d'expression pK7WGF2*

Grâce à ce clonage, nous avons pu procéder à une expression transitoire de NsZnf dans *N.benthamiana* en utilisant *Agrobacterium* comme vecteur d'infection afin de déterminer sa localisation intracellulaire.

**i) Test en stries**

Des cultures liquides en milieu riche YPDA sont lancées à partir des colonies apparues sur les boîtes de transformants. Une fois que les cultures ont atteint une  $DO_{600}$  de 0,2, une strie est réalisée à partir de chaque culture en parallèle sur une boîte de milieu solide SD-LT ou SD-LTH.

**C. Analyse de la protéine NsZnf issue du crible simple hybride**

**1. Purification de protéines munies d'une étiquette**

**a) Induction**

La protéine NsZnf portant un épitope Tag poly(His) est clonée dans le vecteur pDest17. Après transformation des bactéries BL21, une colonie isolée est mise en pré-culture (20 ml) de LB + ampicilline (LB Amp). Le lendemain, 25ml de la pré-culture saturée sont utilisés pour ensemer 500 ml de milieu « LB+Ampicilline ». Lorsque la  $DO_{600}$  est d'environ 0.4 (environ 2 heures de culture), 5ml de L-Arabinose 20% sont ajoutés à la culture pour induire de la transcription du gène d'intérêt.

**b) Purification en conditions dénaturantes**

Pour obtenir un niveau maximum de protéines, une cinétique d'induction est réalisée. Aussi, des aliquots de 1 ml sont prélevés à temps zéro, puis toutes les heures 3 ou 4 heures après l'induction par addition d'arabinose. Les bactéries sont ensuite centrifugées 20 min à 4000 g à raison de 4x125ml. Les culots sont resuspendus dans 5 ml de tampon de lyse. La lyse des bactéries a été réalisée à l'aide de la French Press dans le tampon de lyse du Kit (100mM  $NaH_2PO_4$ , 10mM Tris-Cl, 8M Urée). La lyse se poursuit à température ambiante sous agitation jusqu'à l'obtention d'un lysat clair. Ce dernier est centrifugé 30 min à 10000g, le surnageant contenant les protéines solubles est conservé. Sur un aliquot de 5 $\mu$ l, on rajoute 5 $\mu$ l de tampon de charge 2X et le reste est conservé à -20°C. La purification de la protéine candidate est effectuée en conditions dénaturantes sur colonne Ni-NTA en utilisant une concentration de 500mM Imidazol (Kit QIAexpressionist<sup>TM</sup> (QIAGEN)).

Pour obtenir notre protéine soluble, nous avons procédé à une culture bactérienne à 30°C pendant 4h après induction. La purification de la protéine candidate est effectuée en conditions natives sur colonne Ni-NTA en utilisant une concentration de 250mM Imidazol à 4°C (Kit QIAexpressionist™ (QIAGEN)).

### **2. Détection de protéines étiquetées**

La protéine candidate purifiée sur colonne porte un épitope Tag poly(His) en Nterminal. Aussi, il est aisé de détecter la protéine purifiée par western-blot grâce à un anticorps Anti-His. L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes, elle est suivie d'un transfert sur membrane puis d'une détection grâce à un anticorps reconnaissant l'épitope poly(His).

-Tampon de charge 2X :      100 mM Tris HCl  
   4 % SDS  
   0,2 % bleu de bromophénol  
   20 % glycérol  
   β-Mercaptoéthanol 5 % final (ou DTT 200 mM)

Les protéines sont ensuite dénaturées pendant 5 min à 90°C avant d'être déposées sur le gel SDS-PAGE. Le gel se compose de 2 parties : la partie supérieure correspond au gel de concentration [6,6 % acrylamide (v/v) ; 125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,1 % (v/v) SDS] et la partie inférieure correspond au gel de séparation [10 à 15 % acrylamide (v/v) ; 375 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 0,1 % SDS]. L'électrophorèse est réalisée à 10mA puis à 25mA dans du tampon de migration [25 mM Tris-HCl ; 240 mM glycine ; 0,1 % SDS (p/v)]. Après la migration, les protéines sont colorées au bleu de coomassie ou transférées sur membrane PVDF.

#### **a) Coloration des protéines au bleu de coomassie**

Les gels ont été colorés à l'aide de la solution PageBlue (*Fermentas*) en se référant aux indications du fournisseur.

#### **b) Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose**

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF (Schleicher & Schuell) par un appareil de transfert liquide réfrigéré.

Le transfert se déroule à 30V pendant 5h dans du tampon de transfert (39 mM glycine, 48 mM Tris, 0,4 %, 20 % méthanol (v/v)).

L'efficacité du transfert et l'homogénéité des quantités de protéines chargées, est contrôlé par coloration de la membrane PVDF pendant 30s au bleu de Commassie R250 (0,1 % (p/v)), puis décolorée avec une solution de décoloration (Acide acétique 10%(v/v), 50% méthanol (v/v)) pour voir nettement les bandes protéiques. Une fois numérisée, la membrane est décolorée par 2 lavages dans du TBS-T (TBS : Tris-HCl 20 mM pH 8 ; NaCl 150 mM ; Tween 0,02%). Les sites libres de la membrane sont ensuite saturés par incubation dans une solution de TBS-Tween lait (5%), pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C.

### **c) Immunodétection des protéines**

L'anticorps primaire (Anti-His (*Amersham*) ou Anti-HA (*Euromedex*), monoclonaux de souris) est dilué (1/5000ème) dans du TBS-T lait et incubé avec la membrane pendant 2h à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane est lavée 3 fois 10 min avec du TBS-T à température ambiante, puis incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (polyclonal de chèvre anti-souris (*Biorad*)), couplé à la peroxydase de Raifort (HRP), dilué au 1/3000ème dans du TBS-T lait. Après 3 lavages de 10 min avec du TBS-T et 1 lavage de 10 min avec du TBS, la membrane est placée en présence du réactif ECL (Western Blotting reagents detection kit, Amersham-Biosciences). La réaction chimique consiste en l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène, catalysée par la HRP, en condition alcaline. La membrane est incubée pendant une minute avec un mélange équivolume des deux substrats de la HRP. Le signal lumineux produit par cette réaction de chimioluminescence est détecté par exposition d'un film autoradiographique (Kodak Biomax MR-1) avec des temps d'exposition allant de 1 à 15 min selon l'intensité du signal.

#### ***IV. Etude de l'interaction NsZnf/400c par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assays)***

##### ***A. Principe***

La technique du gel retard est basée sur le retard de migration dans un gel natif de polyacrylamide de duplexes d'oligonucléotides de séquences courtes en présence de protéines (ou de complexes protéiques) ayant la propriété de reconnaître spécifiquement la séquence d'intérêt. La variation de migration des duplexes d'ADN (ou sondes) complexés aux protéines par rapport aux duplexes libres est révélée grâce au marquage par une biotine ou par marquage radioactif ( $P^{32}$ ) des sondes nucléotidiques. Le gel retard peut être réalisé à partir de protéines purifiées mais aussi à partir d'un extrait protéique plus complexe (un extrait nucléaire par exemple). La spécificité de reconnaissance des sondes marquées peut être testée par l'ajout en excès du même duplexe non radioactif qui entrent en compétition avec la forme radioactive. La réaction de liaison se déroule à 4°C dans un volume final de 10µl. Pour se faire, 600 nM d'extrait protéique est mis en présence de 200ng de polydIdC (5µg/µl) + 1 µl de tampon de liaison [(10X) (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 50mM, ZnCl<sub>2</sub> 10µM, DTT (ajouté extemporanément) 1mM, BSA 40 ng/µl, Nonidet P-40 0,05%, glycérol 5%] + H<sub>2</sub>O qsp10µl (ou sonde froide pour les compétitions. Le mélange est incubé 30min à 4°C dans la glace. 0,5µl de sonde marquée à 35nM est ajouté et laisser incubé 10min de plus dans la glace.

Gel d'Acrylamide 6%-TBE (0,5X)	TBE 10x	0,3ml
	Acrylamide/BisAcrylamide 29: 1	0,9ml
	Persulfate d'Amonium	30µl
	Temed	3µl
	H <sub>2</sub> O	4,8ml

##### ***B. Electrophorèse et détection de la sonde biotinylée***

Le mélange est rapidement déposé sur un gel de polyacrylamide (6% ; 29:1). Du tampon de charge est déposé dans les deux puits extrêmes du gel pour repérer le front de migration. La migration s'effectue dans du TBE 0,5X (Tris 90 mM, Borate 90 mM, pH 8, EDTA 1mM). L'électrophorèse se déroule à 100Vpendant 2h30 minimum en chambre froide. Le gel est

ensuite démoulé et mis en contact avec une membrane de nitrocellulose N<sup>+</sup> pour procéder au transfert.

### ***C. Transfert sur membrane de nitrocellulose N<sup>+</sup>***

Les complexes séparés par électrophorèse sont transférées électriquement sur une membrane de nitrocellulose N<sup>+</sup> par utilisation d'un appareil de transfert liquide réfrigéré (BioRad). Le transfert se déroule à 380mA pendant 1h30 dans du tampon TBE 0,5X à 4°C. Une fois le transfert fini, la membrane est placée sur du papier wattman imbibé de TBE et enveloppée dans du Saran. Le crosslinking des molécules d'ADN et des complexes protéiques est effectué rapidement sous UV (254nm) pendant 5min.

### ***D. Immunodétection de la sonde marquée***

La membrane est incubée dans une solution bloquante (TBS-tween 0,1%, lait 5%) pendant 1 h à température ambiante. Puis on réalise les lavages selon les prescriptions suivantes :

- Deux lavages rapides au TBS-tween 0,1%
- Un lavage pendant 15 min au TBS-tween 0,1%.
- Deux lavages de 5min au TBS-tween 0,1%.

Dans un deuxième temps, la membrane est incubée dans une solution TBS-tween-Streptavidin-HRP au 1/1000 pendant 1h. La membrane est ensuite lavée dans du TBS-Tween comme indiqué précédemment. La révélation se fait à l'aide du kit ECL-HealthCare pendant 1 min puis 15 min.

## ***V. Biologie Cellulaire***

### ***A. Détection cytologique de l'expression du rapporteur GUS***

#### **1. Préparation des échantillons et coloration GUS**

Les feuilles ou plantules sont introduites directement dans le tampon de coloration et infiltrées sous vide durant 10 minutes. La coloration se fait par incubation à 37 °C durant une nuit. Les tissus sont ensuite décolorés dans du tampon Hoyer's durant 1 à 24 h (la solution est remplacée 2 à 3 fois). Le tampon Hoyer's est ensuite remplacé par du glycérol 25% et les tissus sont montés entre lame et lamelle ou stockés à 4°C.

L'observation se fait sous microscope (Eclipse E-600, *Nikon*) en lumière transmise ou en fond noir, ou sous loupe binoculaire (SZX12, *Olympus*). Les photos ont été prises à l'aide de la caméra *Olympus* DP70.

<b>- <u>Tampon de coloration (1X)</u> :</b>	TP phosphate 1 M, pH7	5 ml
	EDTA 0,5 M, pH 7,5	1 ml
	X-Gluc	25,2 mg
	Eau distillée	qsp 50 ml
<b>- <u>Tampon phosphate 1M pH7</u> :</b>	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M</i>	<i>61,5 ml</i>
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M</i>	<i>38, 5 ml</i>
	<i>Eau distillée</i>	<i>qsp 1L</i>
<b>- <u>Tampon Hoyer's (1X)</u> :</b>	<i>Gomme arabique</i>	<i>7,5g</i>
	<i>Chloral hydrate</i>	<i>100g</i>
	<i>Glycérol</i>	<i>16,7%</i>
	<i>Eau distillée</i>	<i>qsp 30 ml</i>

## 2. Coloration des noyaux au DAPI

La couche épidermique de l'échantillon à colorer est pelée à l'aide d'une pince fine, puis déposée sur une lame. Elle est ensuite recouverte de la solution de coloration (DAPI (molécule fluorescente intercalant de l'ADN, 1 µg/ml), p-phénylène diamine (protecteur de fluorescence, 100 µg/ml), en solution dans du PBS-Tween) puis infiltrée sous vide pendant 5 minutes afin d'augmenter la pénétration de la solution. La solution excédante est alors éliminée puis remplacée par une goutte de glycérol. L'échantillon une fois recouvert avec une lamelle est prêt à être observé au microscope.

## B. Microscopie et imagerie

### 1. Microscopie à épifluorescence

L'observation des noyaux de cellules d'épiderme foliaire a été réalisée sous un microscope optique droit à fluorescence (Eclipse E-600, *Nikon*).



Deux filtres différents sont utilisés pour visualiser les signaux GFP et DAPI, de sorte que la co-localisation n'est permise que par la superposition de deux images. Les photos ont été prises avec une caméra *Olympus DP70* qui permet l'observation en temps réel ainsi que la capture d'image.

Filtres UV :       - DAPI [Excitation (340-380); Fluorescence (435-485)]  
                      - GFP [Excitation (485-495); Fluorescence (500-520)]

### **2. Loupe binoculaire à épifluorescence**

Cette loupe a servi à prendre les photos de plantules des colorations GUS en lumière blanche à l'aide de la caméra DP70.

## ***VI. Bio-Informatique et analyses statistiques***

### ***A. Analyses de séquence***

#### Logiciels spécifiques d'analyse de séquences d'ADN

Le logiciel *Vector NTI (Invitrogen)* et *BioEdit* (Freeware, Tom Hall) ont été utilisés pour les manipulations de séquences, recherches de motifs, alignements de séquences, et l'analyse des résultats de séquençage. Le logiciel *Vector NTI (Invitrogen)* a été utilisé pour les annotations de séquences, et la création de cartes vectorielles virtuelles. Le logiciel MEME ([http://meme.sdsc.edu/meme4\\_1/intro.html](http://meme.sdsc.edu/meme4_1/intro.html)) est utilisé pour la recherche d'éléments cis commun avec d'autres promoteurs trichomes spécifiques. La recherche de motifs protéiques s'est faite sur le site Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>).

### ***B. Analyses statistiques***

Les logiciels Statistica et R+ ont été utilisés pour l'analyse de la variance (**ANOVA : ANalysis Of VAriance**) sur les populations de trichomes exprimant le gène GUS suite au bombardement. Cette analyse statistique nous a permis de comparer les moyennes de plusieurs populations (nombre de spots GUS+ par bombardement avec différentes constructions) afin de mettre en évidence des différences significatives d'expression et/ou de localisation. Dans notre étude, nous avons utilisé une ANOVA à un facteur car les groupes analysés se distinguent par un seul facteur qualitatif (expression ou non du gène GUS). Il existe un équivalent de l'analyse ANOVA connue sous le nom régression linéaire utilisé aussi pour des variables qualitatives.

## Bibliographie

- 1 Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling.** *Plant Cell* 2003, **15**:63-78.
- 2 Agius F, Amaya I, Botella MA, Valpuesta V: **Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression.** *J Exp Bot* 2005, **56**:37-46.
- 3 Altincicek B, Duin EC, Reichenberg A, Hedderich R, Kollas A, Hintz M, Wagner S, Wiesner J, Beck E, Jomaa H: **LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis.** *FEBS Lett* 2002, **532**:437-440.
- 4 Ament K, Kant MR, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC: **Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato.** *Plant Physiol* 2004, **135**:2025-2037.
- 6 Ascensao L., M. Marques, and M.S. Pais, 1997 **Peltate Glandulars trichomes of leonatis leonurus leaves: Ultrastructure and histochemical characterization of secretion.** *Int.J.Plant Sc.* 158, 247-258.
- 7 Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J: **Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana.** *Mol Genet Genomics* 2002, **267**:730-745.
- 8 Ayasse M, Schiestl FP, Paulus HF, Lofstedt C, Hansson B, Ibarra F, Francke W: **Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid Ophrys sphegodes: how does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success?.** *Evolution* 2000, **54**:1995-2006.
- 9 Bailey, J.A., Carter, G.A., Burden, R.S., and Wain, R.L. (1975). **Control of rust diseases by diterpenes from Nicotiana glutinosa.** *Nature* **255**., 328–329
- 10 Bernasconi ML, Turlings TCJ, Ambrosetti L, Bassetti P, Dorn S (1998) **Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid Rhopalosiphum maidis.** *Entomol Exp Appl* 87: 133–142
- 11 Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N: **Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue.** *Plant Physiol* 2004, **135**:1993-2011.
- 12 Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R: **Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:4126-4133.
- 13 Bosabalidis A, Tsekos I (1982) **Glandular Scale Development and Essential Oil Secretion in Origanum-Dictamnus.** *Planta (Heidelberg)* 156, 496-504. Contact: Bosabalidis A, Botanical INST, UNIV THESSALONIKI, THESSALONIKI, GREECE

- 14 Bottega S. and Corsi G. – 2000 – **Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae)** – *Botanical Journal of the Linnean Society*, **132** : 325-335
- 15 Bourett T.M., Howard R.J., O'Keefe D.P., Hallahan D.L. – 1994 – **Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*** – *International Journal of Plant Science*, **155**: 623-632
- 16 Bouwmeester H, Gershenzon J, Konings M, Croteau R: **Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. I. Demonstration Of enzyme activities and their changes with development.** *Plant Physiol* 1998, **117**:901-912.
- 17 Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Mangel TK, Erbe EF, Murphy CA: **Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes.** *Environ Sci Technol* 2004, **38**:5797-5802.
- 18 Caissard J, Bergougnoux V, Martin M, Mauriat M, Baudino S: **Chemical and histochemical analysis of 'Quatre Saisons Blanc Mousseux', a Moss Rose of the *Rosa x damascena* group.** *Ann Bot (Lond)* 2006, **97**:231-238.
- 19 Caissard J.-C., Joly C., Bergougnoux V., Huguency P., Mauriat M. and Baudino S. – 2004 – **Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants** – *Recent Research of Development and Cell Biology*, 2 : 1-15
- 20 Chang, M.C.Y. & Keasling, J.D. **Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes.** *Nat. Chem. Biol.* **2**, 674–681 (2006).
- 21 Chien JC, Sussex IM: **Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.** *Plant Physiol* 1996, **111**:1321-1328.
- 22 Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R: **The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling.** *Nature* 2007, **448**:666-671.
- 23 Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H: **Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes.** *Planta* 2001, **213**:45-50.
- 24 Chung HS, Howe GA: **A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2009, **21**:131-145.
- 25 Clastre M, Bantignies B, Feron G, Soler E, Ambid C: **Purification and Characterization of Geranyl Diphosphate Synthase from *Vitis vinifera* L. cv Muscat de Frontignan Cell Cultures.** *Plant Physiol* 1993, **102**:205-211.
- 26 Croteau R, Gershenzon J, Wheeler CJ, Satterwhite DM: **Biosynthesis of monoterpenes: stereochemistry of the coupled isomerization and cyclization of geranyl pyrophosphate to camphane and isocamphane monoterpenes.** *Arch Biochem Biophys* 1990, **277**:374-381.
- 27 Cutler, H.G., Reid, W., and Deletang, J. (1977). **Plant growth inhibiting properties of diterpen from tobacco.** *Plant Cell Physiol.* **18**:, 711–714.

- 28 D'Auria JC, Chen F, Pichersky E: **Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*.** *Plant Physiol* 2002, **130**:466-476.
- 29 Daniel-Vedele F, Caboche M: **A tobacco cDNA clone encoding a GATA-1 zinc finger protein homologous to regulators of nitrogen metabolism in fungi.** *Mol Gen Genet* 1993, **240**:365-373.
- 30 De Dobbelaar C, Cloutier M, Fouilland M, Legros R, Jolicoeur M: **A high-rate perfusion bioreactor for plant cells.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **95**:1126-1137.
- 31 De Luca V, St Pierre B: **The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis.** *Trends Plant Sci* 2000, **5**:168-173.
- 32 De Moraes CM, Lewis WJ, Pare PW, Alborn HT, Tumlinson JH (1998) **Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids.** *Nature* 393: 570–573
- 33 Degenhardt J, Gershenzon J, Baldwin IT, Kessler A: **Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies.** *Curr Opin Biotechnol* 2003, **14**:169-176.
- 34 Degenhardt J: **Indirect defense responses to herbivory in grasses.** *Plant Physiol* 2009, **149**:96-102.
- 35 Delaney SK, Orford SJ, Martin-Harris M, Timmis JN: **The fiber specificity of the cotton FSLtp4 gene promoter is regulated by an AT-rich promoter region and the AT-hook transcription factor GhAT1.** *Plant Cell Physiol* 2007, **48**:1426-1437.
- 36 B. Dell and A.J. McComb, **Plant resins-their formation, secretion and possible functions,** *Adv. Bot. Res.* 6 (1978), pp. 227–316
- 37 Dicke M: **Specificity of herbivore-induced plant defences.** *Novartis Found Symp* 1999, **223**:43-54; discussion 54-9, 160-5.
- 38 Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J: **Biochemistry of plant volatiles.** *Plant Physiol* 2004, **135**:1893-1902.
- 39 Dufay M, Hossaert-McKey M, Anstett M: **Temporal and sexual variation of leaf-produced pollinator-attracting odours in the dwarf palm.** *Oecologia* 2004, **139**:392-398.
- 40 Duke, S. O. and Paul, R. N. (1993). **Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L.** *International Journal of Plant Science* **154**, 107-118.
- 41 Elmayan T, Tepfer M: **Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter.** *Transgenic Res* 1995, **4**:388-396.
- 42 Fahn, A. 2000 **Structures and functions of secretory cells.** *Adv. Bot. Res.* 31. 37-75
- 43 Folkers U, Kirik V, Schobinger U, Falk S, Krishnakumar S, Pollock MA, Oppenheimer DG, Day I, Reddy ASM, Jurgens G, Hulskamp M: **The cell morphogenesis gene ANGUSTIFOLIA encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton.** *EMBO J* 2002, **21**:1280-1288.

- 44 Frense D: **Taxanes: perspectives for biotechnological production.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **73**:1233-1240.
- 45 Gersbach PV: **The essential oil secretory structures of Prostanthera ovalifolia (Lamiaceae).** *Ann Bot (Lond)* 2002, **89**:255-260.
- 46 Gershenzon J, McConkey ME, Croteau RB: **Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint.** *Plant Physiol* 2000, **122**:205-214.
- 47 Glover J, Grelon M, Craig S, Chaudhury A, Dennis E: **Cloning and characterization of MS5 from Arabidopsis: a gene critical in male meiosis.** *Plant J* 1998, **15**:345-356.
- 48 Guo Z, Severson RF, Wagner GJ: **Biosynthesis of the diterpene cis-abienol in cell-free extracts of tobacco trichomes.** *Arch Biochem Biophys* 1994, **308**:103-108.
- 49 Guo ZH, Wagner GJ (1995) **Biosynthesis of labdenediol and sclareol in cell-free-extracts from trichomes of Nicotiana-glutinosa.** *Planta* 197:627–632
- 50 Gutierrez-Alcala G, Calo L, Gros F, Caissard J, Gotor C, Romero LC: **A versatile promoter for the expression of proteins in glandular and non-glandular trichomes from a variety of plants.** *J Exp Bot* 2005, **56**:2487-2494.
- 51 Gutierrez-Alcala G, Gotor C, Meyer JA, Fricker M, Vega MJ, Romero CL. 2000. **Glutathione biosynthesis in Arabidopsis trichome cells.** *Proceedings of the National Academy of Science* **97**: 11108–1113
- 52 Hallahan DL, West JM: **Cytochrome P-450 in plant/insect interactions: geraniol 10-hydroxylase and the biosynthesis of iridoid monoterpenoids.** *Drug Metabol Drug Interact* 1995, **12**:369-382.
- 53 Hecht S, Eisenreich W, Adam P, Amslinger S, Kis K, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F: **Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:14837-14842.
- 54 Heemann V, Brümmer U, Paulsen C, Seehofer F (1983) **Composition of the leaf surface gum of some Nicotiana species and Nicotiana tabacum cultivars.** *Phytochem.* **22**:133- 135
- 55 Hill R.E., Sayer B.G. and Spencer D. – 1989 – **Biosynthesis of vitamine B6 : incorporation of D-1-deoxyxylulose** – *Journal of American Chemistry Society*, **111** : 1916-1917
- 56 Howe GA, Schilmiller AL: **Oxylipin metabolism in response to stress.** *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**:230-236.
- 57 Hsu CY, Creech RG, Jenkins JN, Ma DP. 1999. **Analysis of promoter activity of cotton lipid transfer protein gene LTP6 in transgenic tobacco plants.** *Plant Science* **143**, 63–70.
- 58 Hudak K, Thompson J: **Subcellular Localization of Secondary Lipid Metabolites Including Fragrance Volatiles in Carnation Petals.** *Plant Physiol* 1997, **114**:705-713.

- 59 Hudak K.A, Thompson. J.E. – 1996 – **Flotation of lipid-protein particles containing triacylglycerol and phospholipid from the cytosol of carnation petals** – *Physiologia Plantarum*, **98** : 810-818
- 60 Hulskamp M, Misra S, Jurgens G: **Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis**. *Cell* 1994, **76**:555-566.
- 61 Hulskamp M, Schnittger A, Folkers U: **Pattern formation and cell differentiation: trichomes in Arabidopsis as a genetic model system**. *Int Rev Cytol* 1999, **186**:147-178.
- 62 Hulskamp M: **Plant trichomes: a model for cell differentiation**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:471-480.
- 63 Ishida T, Hattori S, Sano R, Inoue K, Shirano Y, Hayashi H, Shibata D, Sato S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada T: **Arabidopsis TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation**. *Plant Cell* 2007, **19**:2531-2543.
- 64 Jacobsen SE, Olszewski NE: **Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction**. *Plant Cell* 1993, **5**:887-896.
- 65 Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M: **A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion**. *Plant Cell* 2001, **13**:1095-1107.
- 66 Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR: **TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor**. *Plant Cell* 2002, **14**:1359-1375.
- 67 Julliard JH, Douce R: **Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:2042-2045.
- 68 Kang H, Foley RC, Onate-Sanchez L, Lin C, Singh KB: **Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid**. *Plant J* 2003, **35**:362-372.
- 69 Keene C, Wagner G: **Direct Demonstration of Duvatrienediol Biosynthesis in Glandular Heads of Tobacco Trichomes**. *Plant Physiol* 1985, **79**:1026-1032.
- 70 Kessler A, Baldwin IT: **Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis**. *Annu Rev Plant Biol* 2002, **53**:299-328.
- 71 Khosla C, Keasling JD: **Metabolic engineering for drug discovery and development**. *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:1019-1025.
- 72 Kim SY, Chung HJ, Thomas TL: **Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system**. *Plant J* 1997, **11**:1237-1251.
- 73 Kim DW, Lee SH, Choi S, Won S, Heo Y, Cho M, Park Y, Cho H: **Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns**. *Plant Cell* 2006, **18**:2958-2970.

- 74 Kirik V, Simon M, Wester K, Schiefelbein J, Hulskamp M: **ENHANCER of TRY and CPC 2 (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis.** *Plant Mol Biol* 2004, **55**:389-398.
- 75 Kirik V, Simon M, Huelskamp M, Schiefelbein J: **The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis.** *Dev Biol* 2004, **268**:506-513.
- 76 Knudsen, J. T., Tollsten, L., 1993. **Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa.** *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113** (3) : 263-284.
- 77 Kollner TG, Schnee C, Gershenzon J, Degenhardt J: **The variability of sesquiterpenes emitted from two Zea mays cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes.** *Plant Cell* 2004, **16**:1115-1131.
- 78 Kollner TG, Held M, Lenk C, Hiltbold I, Turlings TCJ, Gershenzon J, Degenhardt J: **A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties.** *Plant Cell* 2008, **20**:482-494.
- 79 Kupper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP: **Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri.** *Planta* 2000, **212**:75-84.
- 80 Kurup S, Jones HD, Holdsworth MJ: **Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds.** *Plant J* 2000, **21**:143-155.
- 81 Kuzuyama T., Takahashi S., Watanabe H. and Seto H. – 1998 – Direct formation of 2Cmethyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-Dxylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate – *Tetrahedron Letters*, **39** : 4509-4512
- 82 Lange BM, Croteau R: **Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint.** *Arch Biochem Biophys* 1999, **365**:170-174.
- 83 Lange BM, Croteau R: **Genetic engineering of essential oil production in mint.** *Curr Opin Plant Biol* 1999, **2**:139-144.
- 84 Lange BM, Croteau R: **Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:13714-13719.
- 85 Larkin JC, Young N, Prigge M, Marks MD: **The control of trichome spacing and number in Arabidopsis.** *Development* 1996, **122**:997-1005.
- 86 Lavy M, Bracha-Drori K, Sternberg H, Yalovsky S: **A cell-specific, prenylation-independent mechanism regulates targeting of type II RACs.** *Plant Cell* 2002, **14**:2431-2450.

- 87 Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam KH, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky E: **Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits.** *Plant Physiol* 2001, **127**:1256-1265.
- 88 Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M: **Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway.** *FEBS Lett* 1997, **400**:271-274.
- 89 Liu HC, Creech RG, Jenkins JN, Ma DP: **Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene Ltp3(1).** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1487**:106-111.
- 90 Liu P, Koizuka N, Martin RC, Nonogaki H: **The BME3 (Blue Micropylar End 3) GATA zinc finger transcription factor is a positive regulator of Arabidopsis seed germination.** *Plant J* 2005, **44**:960-971.
- 91 Lucker J, Bouwmeester HJ, Schwab W, Blaas J, van der Plas LH, Verhoeven HA: **Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl-beta-D-glucopyranoside.** *Plant J* 2001, **27**:315-324.
- 92 Lucker J, Bowen P, Bohlmann J: **Vitis vinifera terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries.** *Phytochemistry* 2004, **65**:2649-2659.
- 93 Lupien S, Karp F, Wildung M, Croteau R: **Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (Mentha) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase.** *Arch Biochem Biophys* 1999, **368**:181-192.
- 94 Luttgen H, Rohdich F, Herz S, Wungsintaweekul J, Hecht S, Schuhr CA, Fellermeier M, Sagner S, Zenk MH, Bacher A, Eisenreich W: **Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of Escherichia coli phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:1062-1067.
- 95 Mahmoud SS, Croteau RB: **Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:8915-8920.
- 96 Mahmoud SS, Williams M, Croteau R: **Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil.** *Phytochemistry* 2004, **65**:547-554.
- 97 Manfield IW, Devlin PF, Jen C, Westhead DR, Gilmartin PM: **Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the Arabidopsis GATA gene family.** *Plant Physiol* 2007, **143**:941-958.
- 98 Martin D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlmann J: **Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems.** *Plant Physiol* 2002, **129**:1003-1018.



- 99 Martin DM, Faldt J, Bohlmann J: **Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily.** *Plant Physiol* 2004, **135**:1908-1927.
- 100 Martin C, Glover BJ: **Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis.** *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**:70-82.
- 101 Martinoia E, Locher R, Vogt E: **Inositol Trisphosphate Metabolism in Subcellular Fractions of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Mesophyll Cells.** *Plant Physiol* 1993, **102**:101-105.
- 102 Mathur J, Chua NH: **Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes.** *Plant Cell* 2000, **12**:465-477.
- 103 Matsushita A, Furumoto T, Ishida S, Takahashi Y: **AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase.** *Plant Physiol* 2007, **143**:1152-1162.
- 104 Mau CJ, West CA: **Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:8497-8501.
- 105 McCaskill D, Croteau R: **Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants.** *Nat Biotechnol* 1999, **17**:31-36.
- 106 Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamonedá I, Carbonero P: **A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone.** *Plant Physiol* 2002, **130**:111-119.
- 107 Miallau L, Alphey MS, Kemp LE, Leonard GA, McSweeney SM, Hecht S, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F, Hunter WN: **Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:9173-9178.
- 108 Miao LH, Chang CJ, Tsai WH, Lee SC: **Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:230-239.
- 109 Morohashi K, Zhao M, Yang M, Read B, Lloyd A, Lamb R, Grotewold E: **Participation of the *Arabidopsis* bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events.** *Plant Physiol* 2007, **145**:736-746.
- 110 Nagy N, Franceschi V, Solheim H, Krekling T, Christiansen E: **Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (*Pinaceae*): anatomy and cytochemical traits.** *Am J Bot* 2000, **87**:302-313.
- 111 Nambara E, Akazawa T, McCourt P: **Effects of the Gibberellin Biosynthetic Inhibitor Uniconazol on Mutants of *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 1991, **97**:736-738.
- 112 Niovi JK, Reithel J: **Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (*Scrophulariaceae*).** *Am J Bot* 2001, **88**:447-454.

- 113 Nishii A, Takemura M, Fujita H, Shikata M, Yokota A, Kohchi T: **Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2000, **64**:1402-1409.
- 114 Ohloff, G.; Demole, E. **Importance of the odoriferous principle of Bulgarian rose oil in flavour and fragrance chemistry.** *J. Chromatogr.* **1987**, 406, 181–183.
- 115 Ohloff, G., *Scent and Fragrances*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1994**
- 116 Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J, Marks MD: **A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules.** *Cell* 1991, **67**:483-493.
- 117 Oppenheimer DG, Pollock MA, Vacik J, Szymanski DB, Ericson B, Feldmann K, Marks MD: **Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:6261-6266.
- 118 Oyama-Okubo N, Ando T, Watanabe N, Marchesi E, Uchida K, Nakayama M: **Emission mechanism of floral scent in *Petunia axillaris*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2005, **69**:773-777.
- 119 Papi M, Sabatini S, Altamura MM, Hennig L, Schafer E, Costantino P, Vittorioso P: **Inactivation of the phloem-specific Dof zinc finger gene DAG1 affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis* seeds.** *Plant Physiol* 2002, **128**:411-417.
- 120 Pare P, Tumlinson J: **De Novo Biosynthesis of Volatiles Induced by Insect Herbivory in Cotton Plants.** *Plant Physiol* 1997, **114**:1161-1167.
- 121 Pare P, Tumlinson J: **Plant volatiles as a defense against insect herbivores.** *Plant Physiol* 1999, **121**:325-332.
- 122 Payne CT, Zhang F, Lloyd AM: **GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1.** *Genetics* 2000, **156**:1349-1362.
- 123 Perazza D, Vachon G, Herzog M: **Gibberellins promote trichome formation by Up-regulating GLABROUS1 in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 1998, **117**:375-383.
- 124 Perazza D, Herzog M, Hulskamp M, Brown S, Dorne AM, Bonneville JM: **Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutations in at least five genes.** *Genetics* 1999, **152**:461-476.
- 125 Peters RJ, Flory JE, Jetter R, Ravn MM, Lee HJ, Coates RM, Croteau RB: **Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*): characterization and mechanism of action of the "pseudomature" recombinant enzyme.** *Biochemistry* 2000, **39**:15592-15602.
- 126 Phillips M, Croteau R: **Resin-based defenses in conifers.** *Trends Plant Sci* 1999, **4**:184-190.
- 127 Pichersky E, Gang DR: **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective.** *Trends Plant Sci* 2000, **5**:439-445.

- 128 Pichersky E, Gershenzon J: **The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense.** *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**:237-243.
- 129 Piechulla B, Pott MB: **Plant scents--mediators of inter-and intraorganismic communication.** *Planta* 2003, **217**:687-689.
- 130 Prisia S, Xu M, Wilderman PR, Peters RJ: **Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions.** *Plant Physiol* 2004, **136**:4228-4236.
- 131 Qiu J, Jilk R, Marks MD, Szymanski DB: **The Arabidopsis SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development.** *Plant Cell* 2002, **14**:101-118.
- 132 Ramsay NA, Glover BJ: **MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity.** *Trends Plant Sci* 2005, **10**:63-70.
- 133 Reisdorf-Cren M, Carrayol E, Terce-Laforgue T, Hirel B: **A novel HMG A-like protein binds differentially to the AT-rich regions located in the far distal and proximal parts of a soybean glutamine synthetase gene (GS15) promoter.** *Plant Cell Physiol* 2002, **43**:1006-1016.
- 134 Richardson HH. 1943. **The action of bean leaves against the bedbug.** *Journal of Economic Entomology* **36**: 543–545
- 135 Roberts SC: **Production and engineering of terpenoids in plant cell culture.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:387-395.
- 136 Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G: **Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants.** *Plant J* 2001, **28**:619-631.
- 137 Rodriguez-Concepcion M, Boronat A: **Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics.** *Plant Physiol* 2002, **130**:1079-1089.
- 138 Rogers HJ, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, Lonsdale DM, Twell D: **Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10.** *Plant Mol Biol* 2001, **45**:577-585.
- 139 Rohdich F, Wungsintaweeikul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH: **Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of Escherichia coli catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:11758-11763.
- 140 Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H: **Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate.** *Biochem J* 1993, **295** ( Pt 2):517-524.
- 141 Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S. and Sahm H. – 1996 – **Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis –** *Journal of American Chemistry Society*, **118** : 2564-2566

- 142 Sallaud C, Rontein D, Onillon S, Jabes F, Duffe P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G, Leonhardt N, Causse M, Tissier A: **A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*.** *Plant Cell* 2009, **21**:301-317.
- 143 Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995. **Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard.** *Plant Physiology* 109: 1427–1433
- 144 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. –1989 – **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 145 Schellmann S, Schnittger A, Kirik V, Wada T, Okada K, Beermann A, Thumfahrt J, Jurgens G, Hulskamp M: **TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*.** *EMBO J* 2002, **21**:5036-5046.
- 146 Schepmann HG, Pang J, Matsuda SP: **Cloning and characterization of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis.** *Arch Biochem Biophys* 2001, **392**:263-269.
- 147 Schnee C, Kollner TG, Gershenzon J, Degenhardt J: **The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage.** *Plant Physiol* 2002, **130**:2049-2060.
- 148 Schnee C, Kollner TG, Held M, Turlings TCJ, Gershenzon J, Degenhardt J: **The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:1129-1134.
- 149 Shangguan X, Xu B, Yu Z, Wang L, Chen X: **Promoter of a cotton fibre MYB gene functional in trichomes of *Arabidopsis* and glandular trichomes of tobacco.** *J Exp Bot* 2008, **59**:3533-3542.
- 150 Shepherd RW, Bass WT, Houtz RL, Wagner GJ: **Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes.** *Plant Cell* 2005, **17**:1851-1861.
- 151 Shikata M, Takemura M, Yokota A, Kohchi T: ***Arabidopsis* ZIM, a plant-specific GATA factor, can function as a transcriptional activator.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2003, **67**:2495-2497.
- 152 Shimada H, Kondo K, Fraser PD, Miura Y, Saito T, Misawa N: **Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:2676-2680.
- 153 Singh KB: **Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control.** *Plant Physiol* 1998, **118**:1111-1120.
- 154 Solano R, Nieto C, Paz-Ares J: **MYB.Ph3 transcription factor from *Petunia hybrida* induces similar DNA-bending/distortions on its two types of binding site.** *Plant J* 1995, **8**:673-682.

- 155 Sommer S., Severin K., Camara B. and Heide L. – 1995 – **Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon* – *Phytochemistry*, 38 : 623-627**
- 156 Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA: **Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog**. *Science* 2000, **289**:768-771.
- 157 St -Pierre B. and De Luca V. – 2000 – **Evolution of acyltransferase genes : origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism** – In : T. Romea, R. Ibrahim, L. Varin, V. De Luca, eds, *Recent Advances in Phytochemistry Evolution of Metabolic Pathways*, Vol 34. Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, pp 285-315
- 158 Suttipanta N, Pattanaik S, Gunjan S, Xie CH, Littleton J, Yuan L: **Promoter analysis of the Catharanthus roseus geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis**. *Biochim Biophys Acta* 2007, **1769**:139-148.
- 159 Szymanski DB, Lloyd AM, Marks MD: **Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in Arabidopsis**. *Trends Plant Sci* 2000, **5**:214-219.
- 160 Takatsuji H: **Zinc-finger transcription factors in plants**. *Cell Mol Life Sci* 1998, **54**:582-596.
- 161 Teakle GR, Gilmartin PM: **Two forms of type IV zinc-finger motif and their kingdom-specific distribution between the flora, fauna and fungi**. *Trends Biochem Sci* 1998, **23**:100-102.
- 162 Telfer A, Bollman KM, Poethig RS: **Phase change and the regulation of trichome distribution in Arabidopsis thaliana**. *Development* 1997, **124**:645-654.
- 163 Thaler JS (1999) **Jasmonate-inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores**. *Nature* 399: 686–688
- 164 Theodoulou FL: **Plant ABC transporters**. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1465**:79-103.
- 165 Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J: **JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling**. *Nature* 2007, **448**:661-665.
- 166 Tjaden G, Coruzzi GM: **A novel AT-rich DNA binding protein that combines an HMG I-like DNA binding domain with a putative transcription domain**. *Plant Cell* 1994, **6**:107-118.
- 167 Trapp S, Croteau R: **Defensive resin biosynthesis in conifers**. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001, **52**:689-724.
- 168 Trapp SC, Croteau RB: **Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications**. *Genetics* 2001, **158**:811-832.
- 169 Turlings T, Tumlinson J, Lewis W: **Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps**. *Science* 1990, **250**:1251-1253.

- 170 Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB: **Development of peltate glandular trichomes of peppermint.** *Plant Physiol* 2000, **124**:665-680.
- 171 Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB: **Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint.** *Plant Physiol* 2000, **124**:655-664.
- 172 Turner GW, Croteau R: **Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase.** *Plant Physiol* 2004, **136**:4215-4227.
- 173 Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K: **An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence.** *Plant Cell* 1993, **5**:1529-1539.
- 174 Uphof JCT. 1962. **Plant hairs.** *Encyclopedia of Plant Anatomy IV*, 5: 1–206
- 175 Van Loon JJ, De Boer JG, Dicke M (2000) **Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction.** *Entomol Exp Appl* 97: 219–227
- 176 Van Schie CCN, Haring MA, Schuurink RC: **Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid.** *Plant Mol Biol* 2007, **64**:251-263.
- 177 Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G: **The tify family previously known as ZIM.** *Trends Plant Sci* 2007, **12**:239-244.
- 178 Verberne M, Verpoorte R, van Tegelen LJP, Moreno PRH, Croes AF, Wullems GJ, et al. (1998) **Salicylic acid pathway genes and their use for the induction of resistance in plants.** International Patent Application no 9 62 00 3189, 31/03/98, 6049 US P, 04/04/986049 US P2.
- 179 Verpoorte R, van der Heijden R, Memelink J: **Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production.** *Transgenic Res* 2000, **9**:323-43; discussion 321.
- 180 Wada T, Tachibana T, Shimura Y, Okada K: **Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC.** *Science* 1997, **277**:1113-1116.
- 181 Wagner G: **Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs.** *Plant Physiol* 1991, **96**:675-679.
- 182 Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW: **New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome.** *Ann Bot (Lond)* 2004, **93**:3-11.
- 183 Wagner GJ, Wang EM (2001) **Exploiting the ooze: engineering surface secretion systems of plants. Secretion systems of plants may be molecular farming and pest/disease resistance factor factories of the future.** *AgBiotechNet* 3 (ABN074):1–3
- 184 Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC: **The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein.** *Plant Cell* 1999, **11**:1337-1350.

- 185 Wang E, Wang R, DeParasis J, Loughrin JH, Gan S, Wagner GJ: **Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance.** *Nat Biotechnol* 2001, **19**:371-374.
- 186 Wang E, Gan S, Wagner GJ: **Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L.** *J Exp Bot* 2002, **53**:1891-1897.
- 187 Wang E, Wagner GJ: **Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing.** *Planta* 2003, **216**:686-691.
- 188 Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D: **Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**:20-26.
- 189 Werker E. 1993. **Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the *Lamiaceae*.** A review. *Flavour and Fragrance Journal* **8**: 249±255
- 190 Werker E, Fahn A. 1981. **Secretory hairs of *Inula .iscosa* (L.) Ait. ±Development, ultrastructure, and secretion.** *Botanical Gazette* **142**: 461±476.
- 191 Wildung MR, Croteau R: **A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis.** *J Biol Chem* 1996, **271**:9201-9204.
- 192 Wu A, Liu J: **Isolation of the promoter of a cotton beta-galactosidase gene (GhGal1) and its expression in transgenic tobacco plants.** *Sci China C Life Sci* 2006, **49**:105-114.
- 193 Wu ZL, Yuan YJ, Liu JX, Xuan HY, Hu ZD, Sun AC, Hu CX (1999) **Study on enhanced production of taxol from *Taxus chinensis* var. *mairei* in biphasic-liquid culture.** *Acta Bot Sin* **41**:1108–1113
- 194 Yanagisawa S: **A novel multigene family that the gene for a maize DNA-binding protein, MNB1a belongs to: isolation of genomic clones from this family and some aspects of its molecular evolution.** *Biochem Mol Biol Int* 1996, **38**:665-673.
- 195 Yanagisawa S: **Dof DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions.** *Eur J Biochem* 1997, **250**:403-410.
- 196 Yanagisawa S, Schmidt RJ: **Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors.** *Plant J* 1999, **17**:209-214.
- 197 Yanagisawa S: **Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**:386-391.
- 198 Yazaki K: **Transporters of secondary metabolites.** *Curr Opin Plant Biol* 2005, **8**:301-307.
- 199 Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A: **A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*.** *Development* 2003, **130**:4859-4869.

200 Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A: **The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci.** *Development* 2008, **135**:1991-1999.

201 Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E, Noel JP: **Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family.** *Plant Cell* 2003, **15**:1704-1716.

Brevets :

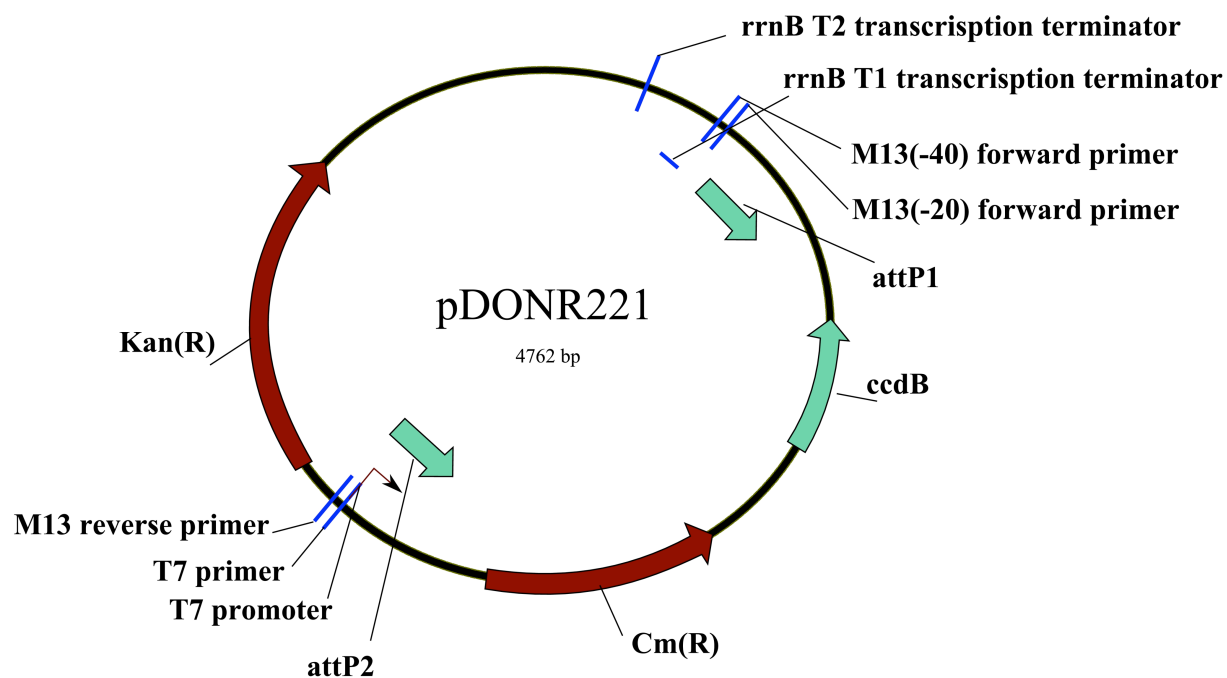
202 Tissier A, Sallaud C, Rontein D: **Plant promoters and uses thereof.** WO 2006/040479 A2. 20.04.2006

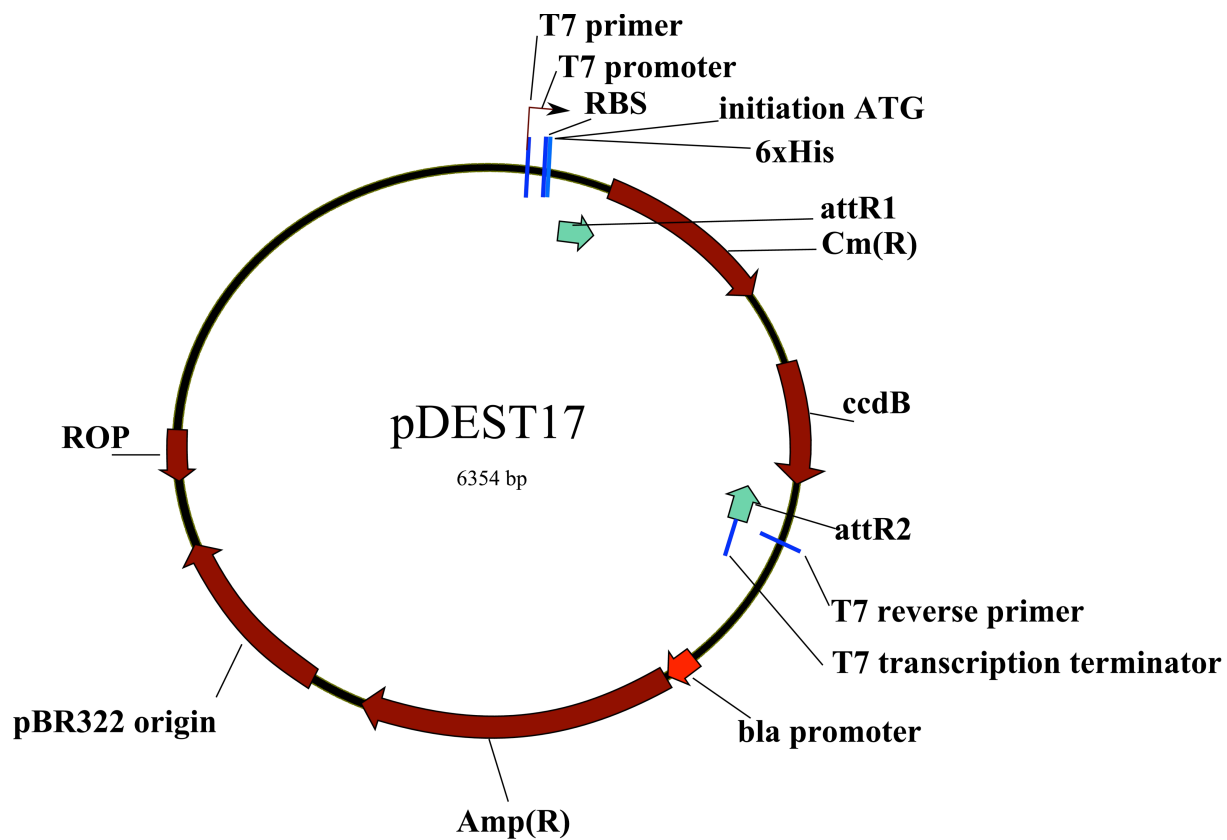
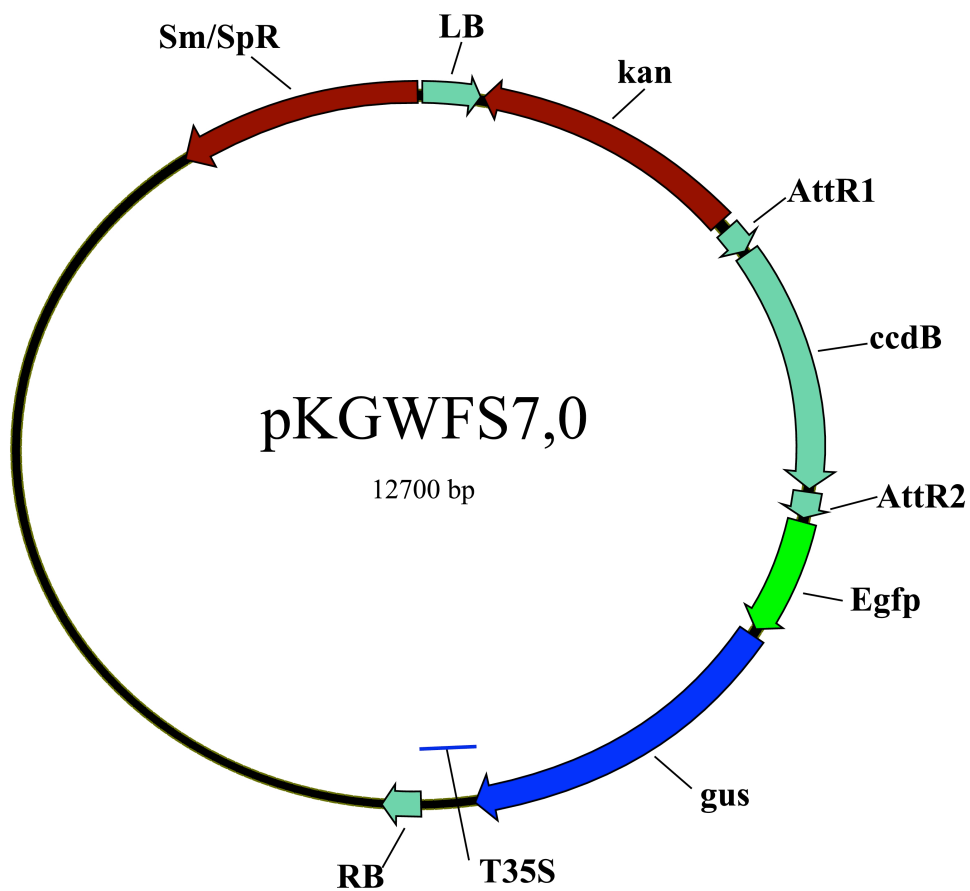
2003 Tissier A, Sallaud C, Rontein D: **System for producing terpenoids in plants.** WO 2006/079727 A1. 03.08.2006

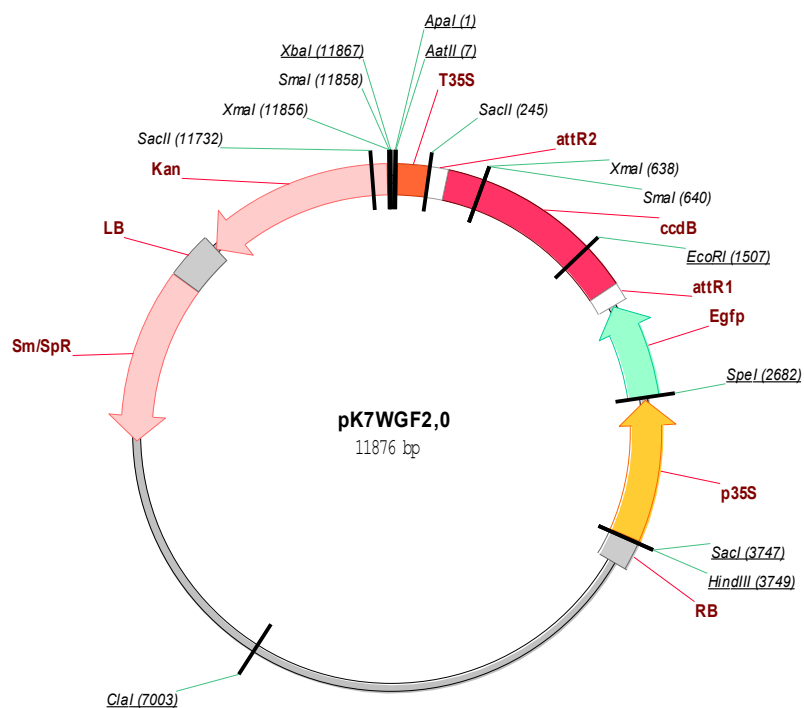


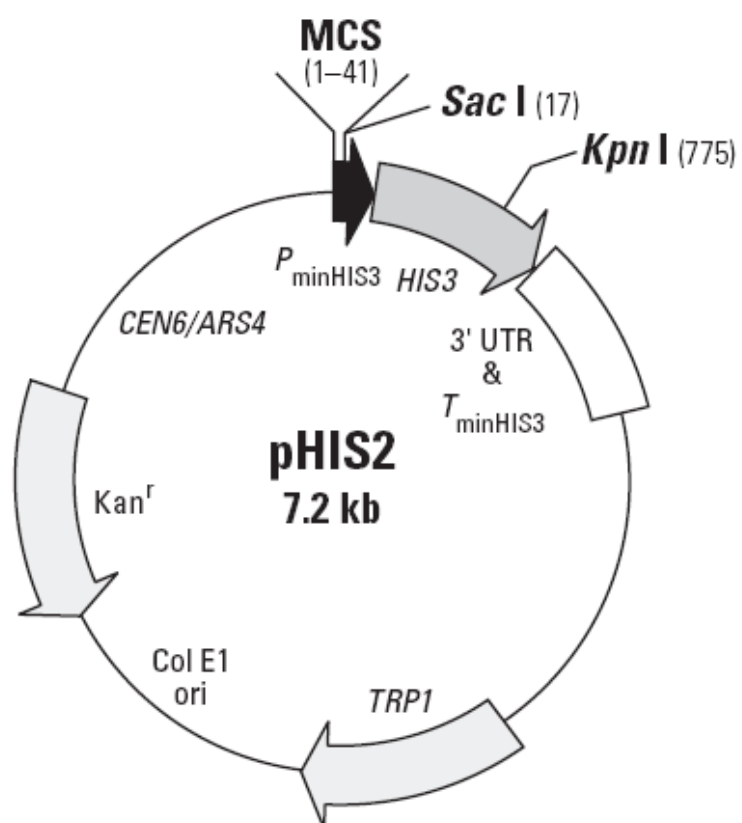
## Annexes

### Vecteurs utilisés

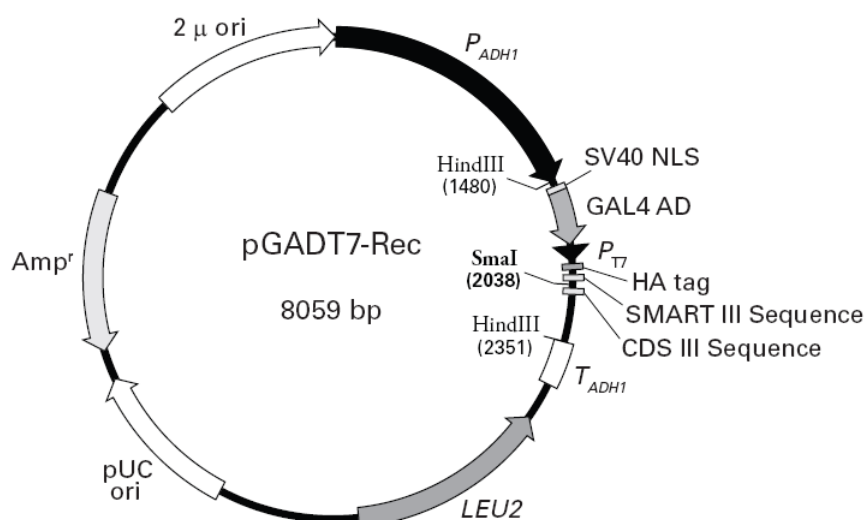




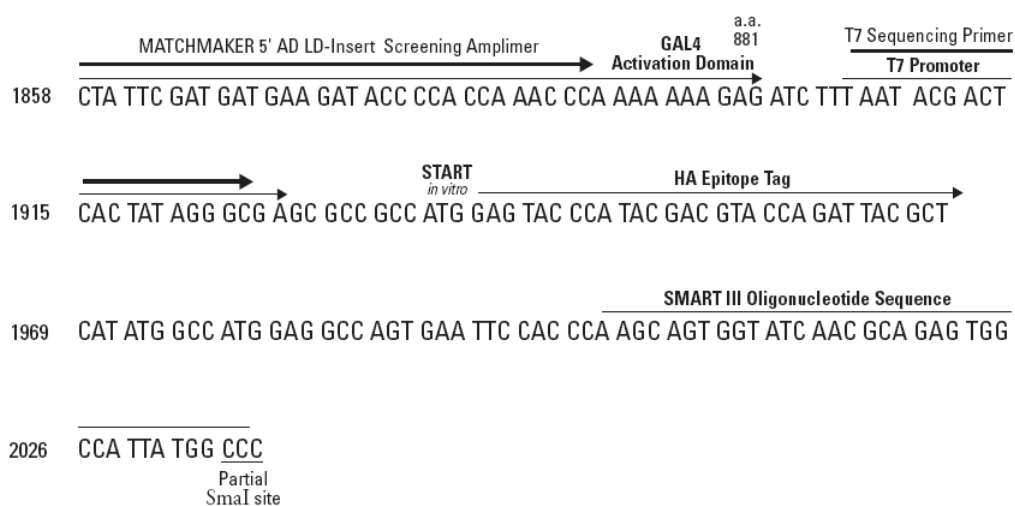




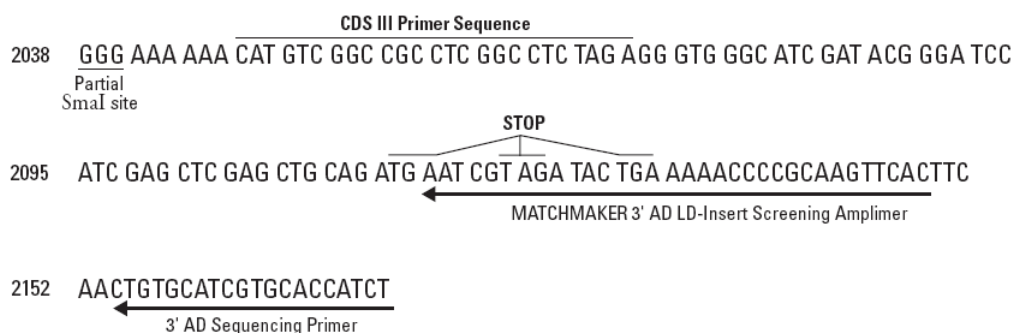
10                      20                      30                      40  
 GAATTCCCGGGGAGCTCACGCGTTCGCGAATCGATCCGCGGTCTAGA  
 EcoRI   SmaI   SacI   MluI                      SacII\*

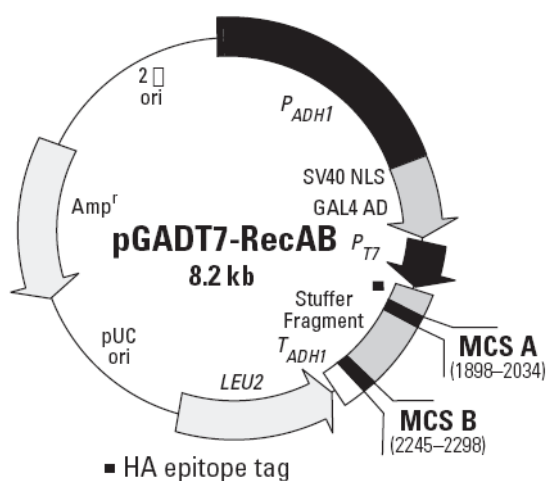


### SMART™ III terminus

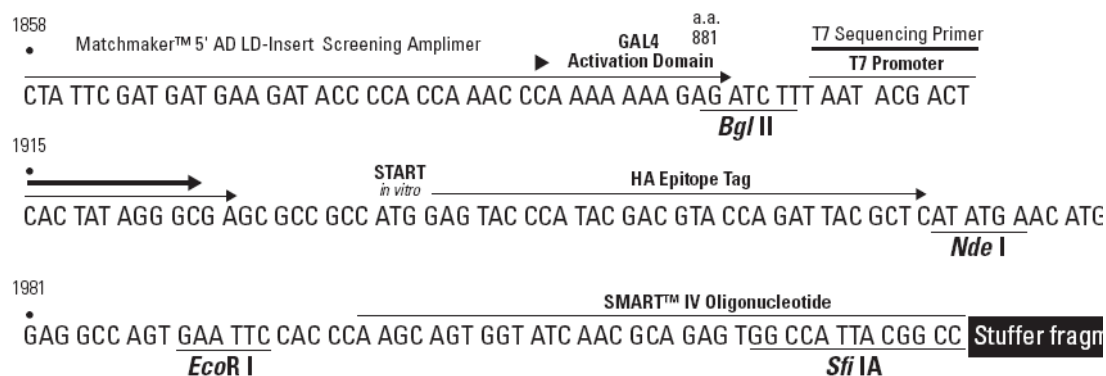


### CDS III terminus

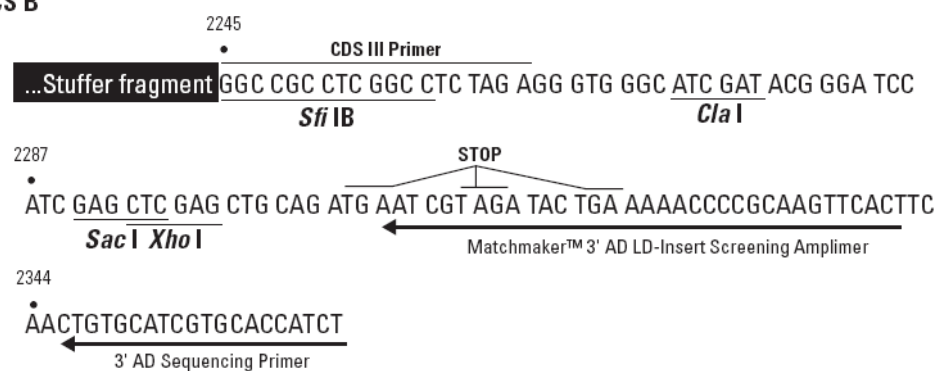




**MCS A**



**MCS B**



***Lignées transgéniques T1***

CONSTRUCTIONS	LIGNEES	GRAINES SEMEES	GRAINES GERMEES	PLANTES RESISTANTES
CBTS1.1	C11	100	99	98
	C2	100	97	93
	C5	100	100	75
	C6	100	85	83
	C12	123	123	83
Δ1s	C16	100	73	53
	C2	100	99	3
	C6	100	98	78
	C1	100	100	71
	C11	100	90	72
Δ4s	C13	133	132	104
	C15	125	108	77
	C8	100	100	0
	C7	100	100	75
Δ5s	C3	100	75	56
	C8	110	110	80
	C6	100	100	64
	C1	100	98	73
Δ1c	C14	100	98	83
Δ3c	C7	100	100	75
	C2	100	89	42
	C3	100	86	72
	C6	100	99	71
Δ4c	C5	100	97	23
	C10	100	98	88
	C31	100	97	77
	C26	100	98	84
	C7	100	100	92
	C14	100	100	73
Δ400c	C1	100	96	75
	C4	100	98	93
	C6	100	96	96
	C5	100	100	84
	C11	100	98	94
	C22	100	97	84
	C9	100	99	87
	C19	100	89	79
Δ46::35S	C40	125	125	125
	C8	125	124	97
	C2	125	125	0
WtN.s		100	100	0

Oligonucléotides de cette étude

Utilisation	Information		Orientation	Séquence	Tm
Mutagenèse dirigée par PCR de P <sub>NsTPSO2a</sub>	Sauvage P <sub>NsTPSO2a</sub>		Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGTCGACAATTTA TTTTGTAAAACTTCTCTA	65
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ1s		Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGGTAGCCATTAA GTTAGTTTTCGCCAC	68
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ2s		Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGGTACAGTAAT TTCAGACGTGTGGC	69
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ3s		Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCGTGGCAAAAA AATACGATTAATA	66
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ4s		Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCTATGAAATTT TAATTTTGTGGCTA	65
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ5s		Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCCCTCTATTTT ACAACAATTACCAACA	66
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ1c	I	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGTCGACAATTTA TTTTGTAAAACTTCTCTA	65
			Reverse	TTGGTAATTGTTGTAAAAATAGAGGGCTATTTACA ATTCATAAAAAAATTA	56
		II	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCCCTCTATTTT ACAACAATTACCAACA	66
			Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTGTT TAATTAATTGTAAATGTAATTGTAATGTTGTTTG	63
	Δ3c	I	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGTCGACAATTTA TTTTGTAAAACTTCTCTA	65
			Reverse	GTAGTGAATCGTATTTTTTTGCCACGAATATTAATC TTCTAGTCACGAAAT	59
		II	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCTATGAAATTT TAATTTTGTGGCTA	65
			Reverse	GTAGTGAATCGTATTTTTTTGCCACGAATATTAATC TTCTAGTCACGAAAT	



	$\Delta 4c$	I	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCTCGAGTCGACAATTTA TTTTGTAAAACTTCTCTA	65
			Reverse	GCCACACGTCTGAAATTAAGTGTAGCCTTATTCTGA TACAATAAAATTTTGTA	60
		II	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCGTGGCAAAAA AATACGATTAATA	66
			Reverse	GCCACACGTCTGAAATTAAGTGTAGCCTTATTCTGA TACAATAAAATTTTGTA	60
	$\Delta 400c$	I	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCTCGAGTCGACAATTTA TTTTGTAAAACTTCTCTA	65
			Reverse	TAGCCACAAAAATTAATTTTCATAGAATATTAAT CTTCTAGTCACGAAAT	56
		II	Forward	ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCTCGAGCCCTCTATTTT ACAACAATTACCAACA	66
			Reverse	GCCACACGTCTGAAATTAAGTGTAGCCTTATTCTGA TACAATAAAATTTTGTA	60

Utilisation	Information	Orientation	Séquence	Tm
Génotypage	Sauvage $P_{NsTPSO2a}$	Forward	AGCTCATTAAGTCCAGAAACCCG	56,9
		Reverse	GTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGGT	56,1
	$\Delta 1s$	Forward	AGCTCATTAAGTCCAGAAACCCG	56,9
		Reverse	GTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGGT	56,1
	$\Delta 4s$	Forward	AGCTCATTAAGTCCAGAAACCCG	56,9
		Reverse	GTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGGT	56,1
	$\Delta 5s$	Forward	AGCTCATTAAGTCCAGAAACCCG	56,9
		Reverse	GTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGGT	56,1
	$\Delta 1c$	Forward	TGGGTAATATTGCTACGACAGTTAGCA	56,5
		Reverse	GTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGGT	56,1
	$\Delta 4c$	Forward	TAATCGCAGTAATATTGGAGGTGC	55,7
		Reverse	GCCAAACGAGTTTCTAGTTCCTTTAC	56,5
	$\Delta 3c$	Forward	GTAGCCATTAAGTTAGTTTCGCCA	55,2
		Reverse	GCCAAACGAGTTTCTAGTTCCTTTAC	56,5
	$\Delta 400c$	Forward	GTAGCCATTAAGTTAGTTTCGCCA	55,2
		Reverse	GCCAAACGAGTTTCTAGTTCCTTTAC	56,5

